



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**DANIEL AUGUSTO CAVALCANTE**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA APLICAÇÃO DO OZÔNIO NA  
CADEIA DE PRODUÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
DOUTOR EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**Prof. Dr. Marcelo Cristianini  
ORIENTADOR**

**Este exemplar corresponde à versão final da tese  
defendida por Daniel Augusto Cavalcante, aprovada  
pela comissão julgadora em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ e  
orientado pelo *Prof. Dr. Marcelo Cristianini*.**

---

**Prof Dr. Marcelo Cristianini**

**CAMPINAS, 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
LUCIANA P. MILLA – CRB8/8129- BIBLIOTECA DA FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

C314a Cavalcante, Daniel Augusto  
Avaliação da eficiência da aplicação do ozônio na  
cadeia de produção do queijo minas frescal / Daniel  
Augusto Cavalcante. -- Campinas, SP: [s.n], 2012.

Orientador: Marcelo Cristianini.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Leite cru. 2. Queijo minas frescal. 3. Sanitização.  
4. Ozônio. I. Cristianini, Marcelo. II. Universidade  
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de  
Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Efficiency evaluation of ozone application in the production  
chain of minas frescal cheese

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Milk

Minas frescal cheese

Sanitization

Ozone

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Marcelo Cristianini [Orientador]

Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Walkiria Hanada Viotto

Viviane Ribeiro Pinheiro Coelho

Rodrigo Rodrigues Petrus

Data da defesa: 16/02/2012

Programa de Pós Graduação: Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Marcelo Cristianini

---

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

---

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto

---

Profa. Dra. Viviane Ribeiro Pinheiro Coelho

---

Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Petrus

---

Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura

---

Prof. Dr. Flávio Luis Schmidt

---

Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant

## Resumo Geral

O leite, por ser um alimento nutritivo e completo, é altamente consumido em todo o mundo, tanto na sua ingestão direta como através de seus derivados. Muitas ações são colocadas em prática para garantir sua qualidade, desde cuidados com a saúde dos animais leiteiros até a utilização de tratamentos para garantir uma maior vida de prateleira dos produtos lácteos. O ozônio por estar sendo estudado, atualmente, na indústria de alimentos, e, por ser um produto utilizado nas formas líquida e gasosa foi o sanitizante utilizado para a efetivação dos experimentos. O presente estudo buscou avaliar a eficiência da aplicação do ozônio na indústria de laticínios, analisando suas características frente à: desinfecção da pele do teto das vacas antes da ordenha, inativação microbiana no leite *in natura*, aumento na estabilidade de queijo minas frescal e sanitização de equipamentos e ar ambiente de câmaras frigoríficas de estocagem de queijo minas frescal. Foi utilizado o sanitizante na forma líquida (água ozonizada), na concentração de  $2,0\text{mg.L}^{-1}$ , para os estudos de sanitização da pele do teto das vacas e para imersão do queijo minas frescal; e na forma gasosa para borbulhamento no leite e para sanitização da câmara fria, nas concentrações de  $1,5$  e  $0,03\text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Foi realizado delineamento inteiramente casualizado e os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Os microrganismos aeróbios mesófilos e *Staphylococcus sp.* na pele do teto das vacas apresentaram reduções de 2,36 e 2,03 ciclos logarítmicos, para clorexidina e 2,52 e 1,99 ciclos logarítmicos para a água ozonizada, respectivamente. Para estes tratamentos não foi verificada diferenças estatísticas significativas ( $P>0,05$ ). As enterobactérias apresentaram reduções de 1,16 e 1,50 ciclos logarítmicos para a clorexidina (sanitizante utilizado para fins de comparação) e água ozonizada, sendo que estes resultados foram significativamente diferentes para  $P<0,05$ . A utilização do ozônio, na concentração de  $1,5\text{mg.L}^{-1}$ , no tempo de exposição de 15 minutos, apresentou reduções de 0,61; 0,97; 0,13; 1,04 e 0,48 ciclos logarítmicos, respectivamente, para os microrganismos aeróbios mesófilos, psicotróficos, enterobactérias e *Staphylococcus sp.* e bolores e levedura no leite *in natura*. Não foi observada a presença de enterobactérias, coliformes totais e termotolerantes e *Staphylococcus sp.*, nas amostras de queijo minas frescal analisadas. As reduções decimais para as populações de aeróbios mesófilos, bactérias lácticas e bolores e leveduras em queijo minas frescal, imediatamente após a aplicação da água ozonizada na concentração de  $2,0\text{mg.L}^{-1}$ , durante 2 minutos foi de 1,53, 1,90 e 2,34 ciclos logaritmos, respectivamente; Observou-se uma redução de microrganismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras de 0,81 e 1,01 ciclos logarítmicos, respectivamente, no ar ambiente da câmara fria de estocagem de queijo minas frescal, após a aplicação do gás ozônio na concentração de  $0,03\text{ mg.L}^{-1}$ .

**Palavras-chave:** leite *in natura*, queijo minas frescal, sanitização e ozônio.

# EFFICIENCY EVALUATION OF OZONE APPLICATION IN THE PRODUCTION CHAIN OF MINAS FRESCAL CHEESE

## General Abstract

Milk, as a complete and nutritious food, is highly consumed worldwide, both in its direct ingestion and through its derivatives. Many actions are put into practice to ensure its quality, since health care of the dairy cattle to the use of treatments to ensure a longer shelf life of dairy products. Ozone has been studied nowadays in the food industry and was used in liquid and gaseous forms as sanitizer for the experiments described here. This study tried to evaluate the effectiveness of ozone application in the dairy industry, analyzing its characteristics according to: the teat skin disinfection before milking the cows, microbial inactivation in raw milk, stability increase of minas frescal cheese, equipment, maturation and cold-storage sanitizing. The sanitizer was used in liquid form (ozonated water) at a concentration of  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  for the teat skin sanitizing studies and to immerse the minas frescal cheese; and gaseous form for bubbling milk and cold chamber sanitizing, at concentrations of  $1.5$  and  $0.03 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively. It was considered completely randomized design and the data were evaluated for normality of residuals and homogeneity of variances. The mesophilic aerobic microorganisms and *Staphylococcus sp.* on the teat skin had reductions of 2.36 and 2.03 logarithmic cycles, for chlorhexidine and 2.52 and 1.99 log-cycles for ozonated water, respectively. For these treatments, statistically significant differences were not observed ( $P > 0.05$ ). The *Enterobacteriaceae* had reductions of 1.16 and 1.50 logarithmic cycles for chlorhexidine and ozonated water, and these treatments showed statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). The ozone sanitizer at a concentration of  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  and exposure time of 15 minutes showed reductions of 0.61, 0.97, 0.13, 1.04 and 0.48 logarithmic cycles, respectively, for the mesophilic aerobic microorganisms, psychotropic, *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus sp.*, molds and yeast in the raw milk. We did not observe the presence of *Enterobacteriaceae*, total coliforms, thermotolerants and *Staphylococcus spp.* in the minas frescal cheese samples analyzed. The decimal reductions for the populations of aerobic mesophiles, lactic bacteria, yeasts and molds in the minas frescal cheese, immediately after the application of ozonated water at a concentration of  $2.0 \text{ mg.L}^{-1}$  for 2 minutes were 1, 53, 1.90 and 2.34 log-cycles, respectively. There was a reduction of mesophilic aerobic, yeast and mold of 0.81 and 1.01 log-cycles, respectively, in the minas frescal cheese cold storage and maturation, after application of ozone gas concentration of  $0.03 \text{ mg.L}^{-1}$ .

**Keywords:** Milk, minas frescal cheese, ozone sanitization.

## Sumário

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1 CAPITULO I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
1.1 Panorama Geral da Pecuária Leiteira no Brasil .....	5
1.2 Leite .....	8
1.3 Qualidades do leite.....	10
1.4 Processo de ordenha .....	15
1.5 Queijo Minas Frescal.....	20
1.6 Ozônio.....	24
1.6.1 Histórico.....	24
1.6.2 Definição.....	25
1.6.3 Geração.....	26
1.6.4 Eficácia .....	27
1.6.5 Mecanismo de ação.....	30
1.6.6 Tratamentos combinados .....	34
1.6.7 Toxicidade e Legislação.....	36
1.7 Referências Bibliográficas.....	37
2 CAPÍTULO II. AÇÃO DA ÁGUA OZONIZADA NA DESINFECÇÃO DA PELE DOS TETOS DE VACAS HOLANDESAS ANTES DA ORDENHA E SUA INFLUÊNCIA NA QUALIDADE DO LEITE BOVINO .....	50
<b>Resumo</b> .....	50
<b>Abstract</b> .....	51
2.1 Introdução .....	52
2.2 Material e Métodos.....	54

2.2.1	Definição dos grupos experimentais e repetições .....	54
2.2.2	Higienização dos Tetos .....	55
2.2.3	Sanitizantes .....	56
2.2.4	<i>Swab-Test</i> dos Tetos das Vacas .....	57
2.2.5	Análises laboratoriais.....	58
2.3	Análises Estatísticas .....	60
2.3.1	Sanitização dos tetos.....	60
2.4	Resultados e Discussão.....	61
2.5	Conclusões .....	69
2.6	Agradecimentos .....	70
2.7	Referências Bibliográficas.....	70
3	CAPÍTULO III. EFEITO DO BORBULHAMENTO DO GÁS OZÔNIO SOBRE A POPULAÇÃO DE PSICOTRÓFICOS, AERÓBIOS MESÓFILOS E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL NO LEITE <i>IN NATURA</i> .....	73
	Resumo .....	73
	Abstract .....	74
3.1	Introdução .....	75
3.2	Material e Métodos.....	77
3.2.1	Matéria-Prima .....	77
3.3	Gerador de Ozônio.....	78
3.4	Tensoativo Polissorbato 80 .....	78
3.4.1	Tratamento e Amostragem do Leite com Ozônio Borbulhado .....	79
3.4.2	Meios de Cultura e Análises Microbiológicas .....	79
3.5	Análises Estatísticas .....	81
3.6	Resultados e Discussão.....	83

3.6.1	Tratamentos com Ozônio .....	83
3.7	Conclusões .....	88
3.8	Agradecimentos .....	89
3.9	Referências Bibliográficas.....	89
4	CAPÍTULO IV. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE QUEIJO MINAS FRESVAL TRATADO COM ÁGUA OZONIZADA .....	92
	Resumo.....	92
	Abstract .....	93
4.1	Introdução .....	94
4.2	Material e Métodos.....	95
4.2.1	Matéria-prima.....	95
4.2.2	Análises laboratoriais.....	98
4.2.3	Análises estatísticas .....	100
4.3	Resultados e Discussão.....	101
4.4	Conclusões .....	114
4.5	Agradecimentos .....	114
4.6	Referências Bibliográficas.....	114
5	CAPÍTULO V. EFEITOS DO GÁS OZÔNIO NA SANITIZAÇÃO DE CÂMARAS FRIGORÍFICAS.....	117
	Resumo.....	117
	Abstract .....	118
5.1	Introdução .....	119
5.2	Material e Métodos.....	121
5.2.1	Análise Estatística .....	123
5.3	Resultados e Discussão.....	125

5.4	Conclusões .....	131
5.5	Agradecimentos .....	132
5.6	Referências Bibliográficas.....	132

## Índices de figuras

Figura 2.1 – Processo de Sanitização dos Tetos com a utilização de frasco lavador tipo <i>one way</i> .....	56
Figura 2.2 – Área média dos tetos amostrados.....	58
Figura 2.3 – Frasco Lavador revelando depósito de areia junto ao fundo.....	66
Figura 3.1 – Equipamento gerador de Ozônio fabricado pela empresa Interozone. .....	78
Figura 3.2 – Apresentação gráfica da função quadrática das análises microbiológicas nas amostras do leite <i>in natura</i> nos diferentes tratamentos com gás ozônio.....	86
Figura 4.1 – Fluxograma de produção do Queijo Minas Frescal.....	96
Figura 4.2 – Superfície de resposta para o logarítmico da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos em função do tratamento e dos dias de vida de prateleira. ....	105
Figura 4.3 – Superfície de resposta para o logaritmo da contagem de bactérias lácticas em função do tratamento e da vida de prateleira .....	107
Figura 4.4 – Superfície de resposta para o logarítmico da contagem de bolores e leveduras em função do tratamento e dos dias de vida de prateleira. ....	109
Figura 4.5 – Representação gráfica dos parâmetros físico químicos do queijo minas frescal em relação ao tratamento com água ozonizada.....	112
Figura 5.1 – Representação gráfica das populações de microrganismos aeróbios mesófilos com e sem aplicação do gás ozônio em câmara fria.....	126
<b>Figura 5.2</b> – Representação gráfica das populações de bolores e leveduras com e sem aplicação do gás ozônio em câmara fria. ....	128
<b>Figura 5.3</b> – Representação gráfica das populações de microrganismos aeróbios mesófilos com e sem aplicação do gás ozônio em superfícies de câmara fria. ...	130

## Índice de tabelas

Tabela 1.1 – Aplicações diversas do ozônio na indústria alimentícia.....	34
Tabela 1.2 – Níveis e tempo de exposição de Ozônio previstos em Organizações Mundiais.....	37
Tabela 2.1 – Ação da clorexidina 2% e da água ozonizada na concentração de 2,0mg.L <sup>-1</sup> , utilizados como pré-dipping, em 96 tetos, durante 30s, na redução da contagem de mesófilos aeróbios na pele de tetos de vacas leiteiras da raça holandesa.....	62
Tabela 2.2 – Ação da clorexidina 2% e da água ozonizada na concentração de 2,0mg.L <sup>-1</sup> , utilizados como pré-dipping, em 96 tetos, durante 30s, na redução da contagem de enterobactérias na pele de tetos de vacas leiteiras da raça holandesa.....	64
Tabela 2.3 – Ação da clorexidina 2% e da água ozonizada na concentração de 2,0mg.L <sup>-1</sup> , utilizados como pré-dipping, em 96 tetos, durante 30s, na redução da contagem de <i>Staphylococcus sp</i> na pele de tetos de vacas leiteiras da raça holandesa.....	65
Tabela 2.4 – Média do logaritmo da contagem bacteriana do leite <i>in natura</i> após a sanitização dos tetos com clorexidina 2% e água ozonizada na concentração de 2,0mg.L <sup>-1</sup> .....	67
Tabela 2.5 – Efeito da clorexidina 2% e água ozonizada na concentração de 2,0mg.L <sup>-1</sup> sobre parâmetros físico-química do leite <i>in natura</i> .....	69
Tabela 3.1 – Esquema dos contrastes ortogonais utilizados para estudo dos efeitos dos tratamentos .....	82
Tabela 3.2 – Médias (Log UFC/mL) e respectivos desvios padrão das contagens de microrganismos presentes no leite <i>in natura</i> durante tratamento com gás ozônio a 1,5 mg L <sup>-1</sup> .....	83

Tabela 3.3 – Probabilidades dos contrastes ortogonais para parâmetros microbiológicos do leite <i>in natura</i> submetido ao tratamento com gás ozônio na concentração de 1,5 mg.L <sup>-1</sup> .....	86
Tabela 3.4 – Médias e respectivos desvios padrão das análises físico químicas no leite <i>in natura</i> durante tratamento com gás ozônio a 1,5 mg L <sup>-1</sup> .....	87
Tabela 4.1 – Tratamentos e números de amostras de queijo minas frescal utilizados no experimento.....	97
Tabela 4.2 – Meios de cultura, temperaturas e período de incubação para os microrganismos estudados no queijo Minas Frescal.....	99
Tabela 4.3 – Médias (Log UFC/g) das contagens de microrganismos presentes no queijo minas frescal durante tratamento com água ozonizada a 2,0mg L <sup>-1</sup> , em função do tempo de estocagem .	103
Tabela 4.4 – Equações relativas aos efeitos do tempo de estocagem sobre os tratamentos realizados no queijo minas frescal em função do logaritmo da contagem de aeróbios mesófilos.....	106
Tabela 4.5 – Equações relativas aos efeitos dos dias em estoque sobre os tratamentos realizados no queijo minas frescal em função do logarítmico da contagem de bactérias lácticas. ....	108
Tabela 4.6 – Equações relativas aos efeitos dos dias em estoque sobre os tratamentos realizados no queijo minas frescal em função do logarítmico da contagem de bolores e leveduras. ....	110
Tabela 4.7 – Efeitos dos tratamentos com água ozonizada, nos parâmetros físico-químicos no queijo minas frescal, em função do tempo de estocagem .	111
Tabela 5.1 – Análise de variância para exposição das placas de desenvolvimento de microrganismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras. ....	123
Tabela 5.2 – Análise de variância para swabs das paredes e estante da câmara frigorífica.....	124
Tabela 5.3 – Médias (Log UFC/mL) e respectivos desvios padrão das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos presentes na câmara frigorífica de queijo	

minas frescal com e sem a utilização de ozônio na concentração de 0,03 mg.L <sup>-1</sup> . .....	127
Tabela 5.4 – Médias (Log UFC/mL) e respectivos desvios padrão das contagens de bolores e leveduras presentes na câmara frigorífica de queijo minas frescal com e sem a utilização de ozônio na concentração de 0,03 mg.L <sup>-1</sup> .....	129
Tabela 5.5 – Médias (Log UFC/mL) e respectivos desvios padrão das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos presentes nas superfícies e estante da câmara frigorífica de queijo minas frescal com e sem a utilização de ozônio na concentração de 0,03 mg.L <sup>-1</sup> .....	130

## Lista de Abreviaturas

ABPL	Associação Brasileira de Produtores de Leite
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem de Célula Somática
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FAYS	Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
ISO	<i>International Standards Organization</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NMP	Número Mais Provável
NRD	Número de Reduções Decimais
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>3</sub>	Ozônio
PNMQL	Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite
POAs	Processo de Oxidação Avançada
PPM	Parte Por Milhão
PR	Estado do Paraná
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SIF	Serviço de Inspeção Federal
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UV	Ultra Violeta

## INTRODUÇÃO GERAL

O leite, por ser um alimento nutritivo e completo, é altamente consumido em todo o mundo, tanto na sua ingestão direta como através de seus derivados. Muitas ações são colocadas em prática para garantir sua qualidade, desde cuidados com a saúde dos animais produtores até a utilização de tratamentos para garantir uma maior vida de prateleira.

O sistema agroindustrial do leite, devido a sua participação social, é um dos mais importantes do país. A atividade é praticada em todo o território nacional em mais de um milhão de propriedades rurais e, somente na produção primária, gera acima de três milhões de empregos e agrega mais de seis bilhões ao valor da produção agropecuária nacional, com uma produção em 2009 de 29,2 bilhões de litros de leite. Três importantes fatores marcaram o setor leiteiro nacional, principalmente na última década: o aumento da produção, a redução do número de produtores e o decréscimo dos preços recebidos pelos produtores, com melhoras a partir de 2007 (EMBRAPA, 2011).

Apesar das exigências para que o leite destinado à fabricação de queijos seja submetido à pasteurização, é intensa a comercialização dos queijos que não passam por tais especificações. Além disso, a contaminação do leite pós-pasteurização, a utilização de fermentos inativos, temperaturas inadequadas e incorretas condições de manufatura e estocagem, contribuem também de forma efetiva para o comprometimento da qualidade do produto final (PEREIRA *et al.*, 1999).

Em razão da contagem elevada de microrganismos envolvendo leite e derivados, das dificuldades para a eliminação destes microrganismos desde a ordenha até o processamento/transformação com os tratamentos atualmente disponíveis e do alto consumo de leite fluido e queijos por todas as faixas etárias da população, faz-se necessário a busca por processos alternativos para

aumentar a segurança microbiológica e o tempo de vida de prateleira de produtos lácteos.

Os queijos de massa mole com pH alto e umidade elevada permitem o desenvolvimento de muitos microrganismos. O queijo Minas frescal não é padronizado e sua composição é variável: apresenta de 12 a 18% de proteína; gordura de 20,5% até 29,22%. Durante a fabricação do queijo Minas podem ocorrer perigos que irão comprometer o produto final, dentre eles destacam-se: alta contaminação microbiológica da matéria-prima, recontaminação do leite pós-pasteurizado, temperaturas inadequadas de fabricação e de armazenamento . Assim, as boas práticas de fabricação e as medidas de sanificação durante o processamento são cruciais para a garantia de um produto de qualidade (SANGALETTI, 2009).

Segundo Kim *et al.* (1999) a necessidade de um antimicrobiano potente, assim como tratamentos alternativos para redução da contaminação de alimentos, aumentou nos últimos anos. A indústria alimentícia está pesquisando sanificantes que sejam efetivos contra patógenos e seguros para o uso em suas 'plantas'. Um dos candidatos é o ozônio que está sendo utilizado como sanitizante no tratamento de águas na Europa desde o início do século XX.

O ozônio é a forma triatômica do oxigênio e ao longo dos anos vem sendo amplamente estudado e aplicado pelo homem. É utilizado com muito sucesso para inativar a microflora de carnes, aves, peixes, frutas e hortaliças, sendo aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o uso nas fases aquosas ou gasosas como um agente para tratamento, estocagem e processamento de alimentos.

O ozônio é um forte agente microbiano com alta reatividade e decomposição espontânea em produtos não tóxicos. Pode ser aplicado em alimentos nas formas líquida e gasosa. O ozônio molecular ou seus produtos de decomposição inativam microrganismos rapidamente reagindo com elementos

vitais da célula, como enzimas intracelulares, ácidos nucléicos e membranas celulares. O seu uso combinado a outros processos resulta em um sinergismo, sendo utilizado em muitos casos como mais uma barreira para a redução da carga microbiana. O ozônio é adequado para descontaminar produtos alimentícios, equipamentos, ambientes, superfícies que entram em contato com alimentos, tratamento de água e efluentes, etc. (KIM *et al.*, 1999; KHADRE *et al.*, 2001).

Desta forma o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a eficiência da aplicação do ozônio na cadeia de produção do queijo minas frescal.

Para atingir este objetivo foram propostos os seguintes objetivos específicos que definiram os capítulos desta tese:

a) Estudar a eficiência da ação de água ozonizada, em comparação a Clorexidina, na desinfecção da pele dos tetos antes da ordenha e sua influência na qualidade do leite bovino;

b) Avaliar a ação do gás ozônio, por borbulhamento, como tratamento do leite *in natura*, avaliando a qualidade do mesmo, a partir das contagens das populações de microrganismos psicotróficos, mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, enterobactérias, pesquisa de *Staphylococcus ssp* e *Salmonella spp.*, bem como acompanhar os parâmetros físico-químicos de gordura, proteína, acidez, densidade, acidez, extrato seco desengordurado e pH do produto;

c) Estudar os efeitos da água ozonizada no tempo de estabilidade do queijo minas frescal, avaliando o aumento das populações de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes totais e termotolerantes, bactérias lácticas, bolores e leveduras e *Staphylococcus ssp.*, bem como alteração nos parâmetros físico-químicos de gordura, proteína, acidez e pH, durante a estocagem refrigerada por 30 dias.

d) Avaliar o efeito do gás ozônio sobre as populações de microrganismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras na qualidade microbiológica do ar e superfícies no interior de câmara frigorífica de estocagem de queijo minas frescal.

#### Referências Bibliográficas

EMBRAPA, **EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA** – Gado de Leite. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/>. Acesso em: 06 dez. 2011.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E., CHISM. G.W. Use of ozone to inactivate microorganisms on Lettuce. **Journal of Food Safety**, v.19, p.17-37, 1999.

KHADRE, M.A., YOUSEF, A.E., KIM, J.G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**. Chicago, v.66, n.9, p.1242-1252, 2001.

PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F. Enumeração de coliformes fecais e presença de Salmonellasp. em queijo-de-minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51. n. 5, 1999.

## CAPITULO I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Panorama Geral da Pecuária Leiteira no Brasil

Nos primeiros anos da colonização, os portugueses introduziram o gado bovino no Brasil. Alguns fatores naturais, como as planícies, os cerrados e o clima, ajudaram no aperfeiçoamento dessa atividade no decorrer dos anos, não só do gado de corte, mas também do leiteiro. O processo de criação era primitivo: os animais viviam soltos nos pastos, tornando-se magros e musculosos; os cuidados com o rebanho limitavam-se à cura das feridas dos animais. A escassa produção de leite destinava-se ao consumo da fazenda ou à fabricação de queijos artesanais (GOBBI, 2006).

Nestes cinco séculos de existência, a atividade caminhou sem grandes evoluções tecnológicas (ABPL, 2009). A partir de 1950, coincidindo com o advento da industrialização no Brasil, a pecuária leiteira entrou na sua fase dita moderna, entretanto, o progresso permaneceu lento. Neste período desenvolveu-se um amplo mercado consumidor de leite e produtos lácteos industrializados (SANTOS, 2005). Em 1952, foi consolidada a Lei nº 1283, de Regulamentação da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), influenciando a modernização do setor, e introduzindo novos conceitos e padrões (BRASIL, 1952). Somente por volta de 1980, ocorreu um salto qualitativo da pecuária leiteira, possibilitando afirmar que o progresso transcorrido em apenas duas décadas foram maiores que os dos últimos 500 anos (ABPL, 2009).

Nas décadas de 1970 e 1980, verificou-se a intensificação da presença de multinacionais instalando-se no país por intermédio, principalmente, de aquisições de pequenos laticínios em dificuldades, acentuando, desta forma, a tendência de concentração em mercados formados de produtos com maior valor agregado (iogurtes, queijos finos e *petits suisses*). As cooperativas, por sua vez, concentraram esforços na consolidação e ampliação das Centrais para tentar

dominar o mercado de leite pasteurizado e responder à unificação dos grandes mercados urbanos (CORRÊA, 2003).

A partir da década de 1990, pôde-se observar, mundialmente, a ocorrência de intensa competição, acentuada mudança tecnológica e difusão de informações, abertura comercial, regulamentação dos mercados, globalização e formação de blocos econômicos. Esses processos implicaram em transformações nos cenários mundial, nacional e regional, e seus impactos foram sentidos nas diversas atividades econômicas brasileiras, dentre elas a pecuária leiteira (GOBBI, 2006). Novas exigências foram delineadas para esse setor, tais como: maior tecnologia, conhecimento, qualidade e especialização (GOBBI, 2006; HUNT *et al.*, 2009).

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), o leite está entre os produtos mais importantes da agropecuária brasileira, ficando à frente de produtos tradicionais como café beneficiado e arroz. O Agronegócio do Leite e seus derivados desempenham um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população, envolvendo vários setores da economia (ZOCCAL *et al.*, 2008; EMBRAPA, 2009). De um lado, abrange agroindústrias produtoras de uma série de derivados lácteos industrializados, que utilizam o leite como matéria-prima básica, e de outro, as indústrias de insumos e máquinas que são adquiridas pelos produtores de leite e indústrias de laticínios (EMBRAPA, 2009).

O Brasil ocupou o sexto lugar no ranking dos países produtores de leite, no quesito quantidade, com mais de 25 milhões de litros de leite produzidos em 2007, entretanto, ocupou o 21º lugar em produtividade, com 1.224 kg/vaca/ano. No ano de 2008, a produção brasileira foi de 27.083 milhões de litros de leite e apenas 19 milhões foram recebidos sob inspeção (EMBRAPA, 2009), o que evidencia a baixa produtividade brasileira e a necessidade de uma fiscalização mais rigorosa no setor. Em 2009, segundo dados do Instituto Brasileiro de

Geografia e Estatística (IBGE) a produção de leite no Brasil foi de 29.112 milhões de litros, ocupando o sexto lugar na produção mundial (BRASIL, 2010B), criando expectativas de que o setor lácteo consiga gerar mais lucros à economia por meio da exportação de seus produtos (SIQUEIRA; ALMEIDA, 2010; BRASIL, 2010A).

As razões para determinados países apresentarem baixa produtividade se devem a características próprias de cada nação. No Brasil, por exemplo, a produção leiteira é caracterizada por pequenos e médios produtores, onde as propriedades são comandadas por famílias, que utilizam essa atividade como principal fonte de renda. Em alguns casos ocorre pouco investimento na produção leiteira, gerando pouca produtividade e baixa qualidade no produto final, já que uma parcela pequena desses produtores tem acesso à tecnologia e assistência adequadas na produção. Isso é refletido na qualidade do leite, sendo possível verificar, com relativa frequência, que propriedades com maior produção leiteira, quando comparadas àquelas com menor produção, produzem leite de maior qualidade (TKAEZ *et al.*, 2004 in NERO *et al.*, 2005).

A cadeia produtiva leiteira a cada dia vem se tornando mais importante para a economia do Brasil, apesar de ainda ser caracterizada como típica de pequenos produtores com baixa produtividade, em função desse perfil ocorre pouco investimento na atividade resultando em uma produção leiteira com baixa qualidade, identificada por altas contagens microbianas (NERO *et al.*, 2009).

Porém, Carvalho *et al.* (2006A) realizaram um estudo sobre o Brasil no cenário mundial de lácteos e constataram que o país é um importante produtor de leite, devido a sua produção apresentar um crescimento contínuo e acima da média mundial. Projeções indicam que a produção mundial de leite crescerá aproximadamente 15,9% ao ano, entre 2005 e 2015. No mesmo período, estima-se que a produção brasileira expanda 22% ao ano. Os autores concluíram que melhorias na distribuição de renda em paralelo a marketing institucional podem

contribuir para a expansão do consumo e sustentação do crescimento da oferta com rentabilidade aos produtores.

## 1.2 Leite

O leite é um dos alimentos, em termos nutricionais, mais completos que existe, com elevado valor biológico, reconhecido por fornecer micro e macronutrientes essenciais para o adequado crescimento e desenvolvimento do ser humano em suas diferentes fases da vida, sendo largamente consumido pela população (DAHMER, 2006; FERNANDES, 2007; MORELLI, 2008; RIBEIRO, 2008).

Entende-se por leite natural (íntegro, não adulterado e sem colostro) o produto da glândula mamária de mamíferos, oriundo de ordenha completa e ininterrupta de fêmeas sadias e bem alimentadas (MORAES, 2005; DAHMER, 2006). Na visão biológica, o leite é definido por Bauman (2006) como uma vasta gama de nutrientes (incluindo proteínas, carboidratos, partículas de gordura, água e íons) sintetizados e secretados pela glândula mamária.

Pela ótica da química, Walstra *et al.* (2006) definem leite como uma emulsão líquida em que a fase contínua é formada de água e substâncias hidrossolúveis ao passo que a fase interna ou descontínua é formada, principalmente, de micelas de caseína e de glóbulos de gordura.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entende-se por leite o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas, sendo que o leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda (BRASIL, 1952; BRASIL, 2002).

Diversos fatores, tais como: individualidade, raça, alimentação, estágio de lactação, idade, temperatura ambiental, estação do ano, fatores fisiológicos

(gestação, ciclo estral, etc.), patológicos (mastite), persistência de lactação, tamanho do animal, porção da ordenha e intervalo entre ordenhas, podem interferir na produção e a composição físico-química do leite (COSTA *et al.*, 1992; WEISS *et al.*, 2002; WALDNER *et al.*, 2005). Adicionalmente, existem variações da composição do leite relacionadas à espécie produtora. O leite bovino possui teor de gordura semelhante ao do leite humano apresentando uma boa assimilação por parte do organismo do homem, representando um importante componente nutricional (REIS *et al.*, 2007).

Walstra (2006) afirmou que a composição química do leite determina o seu valor nutricional, seu sabor e aroma, e encontrou a seguinte composição média para o leite bovino: 87% de água, 8,9% de sólidos totais, 4,0% de gordura, 3,3% de proteína, 4,6% de lactose e 0,7% de cinzas. Zanela *et al.* (2006) avaliaram a qualidade do leite em sistemas de produção da região Sul do Brasil e obtiveram como resultado uma composição média para sistemas especializados de 3,6% de gordura, 3,23% de proteína bruta, 4,49% de lactose, 12,18% de sólidos totais; resultados semelhantes aos obtidos por (WALSTRA, 2006).

Devido ao seu elevado teor de nutrientes, à disponibilidade de água e ao pH próximo a neutralidade, o leite constitui um substrato favorável ao desenvolvimento de microrganismos oriundos de processos fermentativos, o que é desejável para a indústria de laticínios. Em contrapartida, também favorece o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores, caso não haja um conjunto de ações preventivas ao longo da cadeia produtiva (DAHMER, 2006).

Conforme Ajzenal (1994), os cuidados devem-se iniciar na obtenção do leite *in natura*, atestando a saúde do animal e do ordenhador, assim como condições higiênicas-sanitárias do ambiente da ordenha. A ordenha mecânica deve ocorrer dentro dos padrões sanitários, porque, mesmo em condições perfeitas, o leite apresenta uma carga microbiana original. Ponsano *et al.* (1999) afirma que os procedimentos feitos no campo, no momento da obtenção e

conservação do leite até a sua entrada no estabelecimento de beneficiamento, ira determinar a quantidade de contaminante no leite e que os cuidados para garantir um leite de boa qualidade como matéria-prima, são essenciais para a fabricação de bons produtos derivados do leite.

### **1.3 Qualidades do leite**

A indústria leiteira atravessa um período de intensas transformações em sua estrutura, e a qualidade do leite é uma das principais exigências, sendo um dos temas mais discutidos atualmente dentro do cenário nacional de produção leiteira (GUERREIRO *et al.*, 2005). A qualidade é definida pela *International Standards Organization (ISO)-2007* como sendo a totalidade das características de um produto ou serviço com capacidade de satisfazer as necessidades exigidas.

Para Oliveira *et al.* (1999) a qualidade do leite é definida por características relativas à sua composição, aspectos físico-químicos e microbiológicos, além do estado de higiene e sanidade do rebanho, que envolve desde a saúde animal até as boas práticas de manejo, passando pela ordenha, refrigeração, acondicionamento, transporte, beneficiamento e embalagem, até chegar à distribuição final do produto para sua comercialização. Desta forma, os critérios mais relevantes para a definição do leite de boa qualidade são o sabor agradável e característico, alto valor nutritivo, baixa carga microbiana, inexistência de agentes patogênicos e outros contaminantes (SANTOS; FONSECA, 2001; DURR *et al.*, 2006).

A correta adoção de medidas de higiene na produção, armazenamento e transporte do leite podem prevenir a contaminação por microrganismos psicotróficos que representam um grave problema econômico para a indústria de laticínio. Podem-se citar como principais fatores que afetam diretamente a contaminação microbiana do leite *in natura* o ambiente em que a vaca fica alojada, a higiene de ordenha, os procedimentos de limpeza dos equipamentos de ordenha e a saúde da glândula mamária (GUERREIRO *et al.*, 2005).

Segundo Oliveira *et al.* (1999) a presença e a multiplicação de microrganismos provocam alterações físico-químicas no leite, diminuindo a sua durabilidade e podendo gerar problemas econômicos e de saúde pública, o que leva o produto a ser submetido a tratamento térmico, visando à eliminação de microrganismos patogênicos e deterioradores, antes do consumo.

Na União Européia, a legislação sobre higiene aplicável a produtos lácteos foi alterada em 01 de janeiro de 2006 com a revogação da Diretriz de Higiene em Laticínios 92/46/EEC. Nessa diretriz, foi estabelecido que pode haver uma contagem total máxima de  $3,0 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> para leite *in natura* destinado à ingestão e que não tenha passado por nenhum tratamento nas 36 horas de aceitação (KOMOROWSKI, 2006).

Todavia, no Brasil, evidências de que o leite produzido e consumido não apresenta, em sua totalidade, a qualidade desejada resultou no desenvolvimento de novas políticas de incentivo à produção leiteira, envolvendo os setores científicos e econômicos da área, em busca de alternativas para alterar esse panorama. Como fruto das novas políticas de desenvolvimento, iniciou-se, em 1996, a elaboração do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL) (NERO, 2005), contudo, somente em 1998, estabeleceu-se um grupo de trabalho para analisar e propor um programa de medidas visando o aumento da competitividade e a modernização do setor no Brasil (BRASIL, 1998).

A versão definitiva das normas de produção leiteira foi publicada em 18 de Setembro de 2002, pelo MAPA, através da Instrução Normativa (IN) nº 51 (BRASIL, 2002), que abrange os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, extinto desde 2007, do Leite Pasteurizado e do Leite *In natura* Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite *In natura* Refrigerado e seu Transporte a Granel.

No Brasil, de modo geral, o leite é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes, com elevados números de microrganismos, o que constitui

um risco à saúde da população, principalmente quando é consumido sem tratamento térmico (CERQUEIRA *et al.*, 1995), porém, em outros países não é diferente, como observa-se em Jayarao *et al.* (2006) que examinaram tanques de leite *in natura* a granel de fazendas familiares do estado norte-americano da Pensilvânia a respeito da presença de patógenos alimentares. Foi constatado que 31,4% dos produtores desconheciam a possibilidade da presença de microrganismos causadores de doença nos seus tanques. Em 6% dos tanques foi detectada a presença de *Salmonella spp.*, em 2,4% de *Escherichia coli*, em 2,8% de *Listeria monocytogenes* e em 1,2% detectou-se a presença de *Yersinia enterocolitica*.

No leite proveniente de animais sadios e obtidos em condições higiênicas adequadas, predominam os seguintes microrganismos: *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium*, além de lactobacilos saprófitas do úbere e canais galactóforos (JAY, 1996; OLIVEIRA, 2005). A contaminação por estes organismos é variável, tanto qualitativa como quantitativamente, em função das condições de higiene existentes (ARCURI *et al.*, 2006).

Pinto *et al.* (2006) determinaram a contagem de bactérias mesofílicas e psicotróficas em amostras de leite *in natura* refrigerado de tanques de fornecedores de um laticínio mineiro. Para bactérias mesofílicas, verificaram uma contagem variando de  $2,5 \times 10^3$  a  $3,0 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e, para psicotróficas, as contagens variaram de  $2,0 \times 10^2$  a  $1,0 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Concluíram que as altas contagens obtidas podem estar relacionadas a inadequados processos de higienização na ordenha e nos tanques de armazenamento e às falhas na produção.

Watanuki (2008) pesquisou bactérias da espécie *Bacillus cereus* em amostras de leite fluido e avaliou a sua multiplicação e a capacidade de germinação de seus esporos a temperatura ambiente e sob refrigeração, após processo de fervura. Foram analisadas 75 amostras, mantidas sob refrigeração

por 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas, das quais, 46 (61,3%) apresentaram contaminação pela bactéria antes de serem submetidas à fervura. Nas amostras mantidas a temperatura ambiente, ocorreu um aumento na contagem bacteriana, de  $1,7 \times 10^3$  para  $2,0 \times 10^3$  UFC/mL, em média, para as amostras de leite pasteurizado tipo B, após a permanência de 6 horas em temperatura ambiente, inclusive atingindo níveis capazes de desencadear uma toxinfecção alimentar, demonstrando a ocorrência da germinação dos esporos e a multiplicação das células vegetativas. Entretanto, alíquotas das mesmas amostras mantidas sob refrigeração a 7°C não atingiram níveis de bactérias preocupantes, enfatizando, desse modo, a necessidade da refrigeração do leite posteriormente ao aquecimento.

Burdová *et al.* (2002) avaliaram a influência da temperatura de estocagem na vida de prateleira de leite pasteurizado e na atividade enzimática de bactérias psicrófilas em leite integral e em leite em pó. Demonstrou-se que o aumento da temperatura de estocagem de 4 para 10°C reduziu a vida de prateleira da nata do leite pasteurizado de 31 para 11 dias e do leite em pó de 32 para 10 dias, respectivamente. A atividade das enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas por microrganismos psicrófilos em diferentes temperaturas de estocagem apresentou um aumento após aproximadamente 3 dias de estocagem a 10°C.

O ambiente em que a vaca permanece alojada foi citado por Guerreiro *et al.* (2005) como um dos principais fatores que afetam a contaminação microbiana do leite *in natura*. Portanto, a manutenção dos animais em ambientes higienizados, secos e confortáveis visa não somente à produção de leite com qualidade, como também minimizar os problemas relativos às mastites (inflamações da glândula mamária) ambientais e, indiretamente, possui reflexo nos índices de mastite contagiosa. Animais com úberes sujos exigem maiores cuidados por ocasião da ordenha. Deve ser dada atenção especial às instalações para vacas secas, novilhas e vacas em lactação como piquetes, sombreamento, dimensão

correta das instalações nos diferentes sistemas de confinamento, natureza da cama e baias ou piquetes de parição (MÜLLER, 2002).

Morelli (2008) avaliou a ocorrência de *Escherichia coli* em ambiente de produção de leite e obteve uma contagem de coliformes termotolerantes entre 0,3 e 21 NMP.mL<sup>-1</sup> em 36,3% das amostras de leite *in natura*, entre 0,3 e 110 NMP para mãos, tetos e teteiras, para utensílios entre 0,3 e 24 NMP.mL<sup>-1</sup> e para a água entre 0,03 e 11 NMP.mL<sup>-1</sup>, o que reforça a premissa de que a implementação de medidas de higiene durante toda a cadeia produtiva do leite torna-se essencial para a obtenção de um produto de qualidade e que, principalmente, não ofereça riscos à saúde do consumidor.

Santana *et al.* (2001) determinaram os principais pontos de contaminação do leite por mesófilos e psicrótrófos no processo de produção leiteira, bem como a eficiência da refrigeração no controle do crescimento destes microrganismos. Foram avaliadas cinco propriedades leiteiras da região de Londrina- PR, analisando-se diversos pontos do processo de produção e pesquisando-se microrganismos aeróbios mesófilos e psicrótrófos. Os principais pontos de contaminação encontrados foram os latões, com uma contagem de  $4,11 \times 10^9$  UFC de mesófilos/latão e  $7,68 \times 10^7$  UFC de psicrótrófos/latão utilizado, os tanques de expansão, com uma contagem de psicrótrófos 44,63% maior em relação a contagem de mesófilos, água residual de equipamentos e utensílios de ordenha e tetos higienizados inadequadamente. No trabalho, os psicrótrófos atingiram contagens entre  $5 \times 10^5$  UFC/mL e  $5,3 \times 10^6$  UFC/mL em apenas 12 horas de refrigeração em média, sendo suficiente para promover alterações sensoriais no leite. No leite refrigerado, o número de psicrótrófos superou o de mesófilos, mostrando que a contagem de mesófilos pode subestimar a real quantidade de microrganismos presentes, sendo os psicrótrófos os indicadores de contaminação ideais neste produto. Como a refrigeração a 4°C não inibe o crescimento deste grupo de microrganismos, deve-se evitar sua incorporação ao

leite durante a produção, havendo necessidade da associação de boas práticas em todo o processo produtivo.

A qualidade do leite está associada à carga microbiana inicial presente no produto, e quanto maior o número de contaminantes e a temperatura de estocagem, menor será o tempo de conservação do mesmo. A prática da refrigeração reduz os custos operacionais de produção, incluindo a deterioração do leite por atividade acidificante de bactérias mesófilas. Entretanto, pode ocasionar problemas tecnológicos associados à atividade de enzimas proteolíticas e lipolíticas de bactérias psicrófilas, que se multiplicam em temperaturas inferiores a 4°C, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento. Grande parte destas enzimas são termoresistentes e estão relacionadas às perdas de qualidade e à redução da vida de prateleira do leite UHT e de outros produtos lácteos (SANTANA, 2001; PINTO *et al.*, 2006).

#### **1.4 Processo de ordenha**

Ordenhar é a ação de comprimir manualmente o teto de um animal, ou empregar a sucção mecânica, para extrair leite; mungir: ordenhar uma vaca (MICHAELIS, 2007). A manipulação dos tetos e outros estímulos relacionados com a ação da ordenha causam impulsos nervosos sensoriais ativadores do sistema nervoso central, liberando ocitocina do lóbulo posterior da glândula pituitária que, transportada pela via sanguínea atinge a glândula mamária, determinando a contração das células mioepiteliais que envolvem os ácinos secretores, causando a movimentação do leite no sistema galactóforo. Em síntese, pode-se afirmar que a ocitocina atua como um agente facilitador da ordenha (ROSENFELD, 2005).

A ordenha, preferencialmente mecânica, deve ocorrer dentro dos mais criteriosos padrões sanitários. Mesmo em condições ótimas, o leite apresentará uma carga microbiana que deve ser mantida constante, evitando a multiplicação da mesma no leite (AJZENTAL, 1994 apud OLIVEIRA, 2005).

Uma série de medidas deve ser seguida durante o processo de ordenha mecânica com a finalidade de diminuir o número de microrganismos que podem ser transferidos ao leite, depreciando sua qualidade microbiológica. A ordenhadeira, a mão do ordenhador, práticas de higiene e lesões nos tetos são fatores importantes que expõem a superfície dos tetos aos microrganismos patogênicos contagiosos, sendo esses transmitidos de animais infectados para não infectados durante o processo de ordenha (AMARAL *et al.*, 2004).

A ordenha envolve diversos fatores importantes que devem ser levados em consideração, como a fisiologia e a saúde do animal, o tipo de ordenha (manual e mecânica), a qualidade higiênico-sanitária de obtenção do leite e a organização e eficiência da mão-de-obra. Na superfície do úbere há uma numerosa e variada microbiota, sendo que o ambiente e as condições de manejo modificam esta população. Assim a quantidade de bactérias sobre a pele dos tetos influencia na qualidade do leite (TAVERNA, 2004).

O interior da glândula mamária, o exterior do úbere, a pele dos tetos e os equipamentos de ordenha e de armazenamento do leite são os principais meios de contaminação microbiana do leite *in natura* (BRITO *et al.*, 2000), necessitando, portanto, de uma higienização adequada durante o processo de ordenha.

Gibson *et al.* (2008) afirmam que, apesar dos estudos realizados sobre a higienização de tetos de vacas, não há um único método recomendado e a eficácia de práticas usuais em relação à redução da contagem microbiana nos tetos ainda é incerta.

A principal função do *pré-dipping*<sup>1</sup> na preparação da vaca para a ordenha é reduzir o máximo possível as bactérias e outros microrganismos da pele dos tetos antes da colocação das teteiras. A redução na contaminação dos

---

1 Ação de sanitizar o teto da vaca, com solução anticéptica, antes da colocação das teteiras.

tetos tem a vantagem de diminuir o número de bactérias no leite, diminuindo a contagem bacteriana total (CBT) e a ocorrência de mastite (SANTOS & FONSECA, 2007). O *pré-dipping* deve ser realizado em todas as vacas, inclusive nas que apresentam mastite clínica, mas neste caso devem ser tomados cuidados especiais para evitar transmissão, trocando a solução antisséptica (ROSA et al., 2009).

Os métodos mais utilizados na higienização de tetos são: lavagem com água; imersão em solução de iodo; imersão em solução de clorexidina; imersão em solução de hipoclorito de sódio e uso de toalhas de papel desinfetantes (AMARAL et al., 2004; BRITO et al., 2000; FONSECA & SANTOS, 2000).

No uso de soluções para desinfecção é importante que seja feita a imersão completa dos tetos na mesma. A utilização de spray não é recomendada, uma vez que não possibilita completa cobertura da superfície dos tetos (FONSECA & SANTOS, 2000).

Magnusson et al. (2006) avaliaram o efeito de diferentes métodos de higienização dos tetos antes da ordenha (*pré-dipping*) na redução de esporos no leite e obtiveram uma redução de aproximadamente 50% para a higienização realizada somente através da secagem com toalhas de papel durante 10 segundos; de 50 a 74% para a higienização realizada com toalhas de papel umedecidas com isopropanol, etanol e alquil benzeno sulfonato em diferentes concentrações, também durante 10 segundos, e de 96% para a higienização com toalhas de papel umedecidas (com ou sem sabão) seguida de secagem com toalhas de papel secas, com duração de 20 segundos, sendo o método mais eficiente observado pelos autores.

Amaral et al. (2004) utilizaram solução de hipoclorito de sódio (150 ppm) no *pré-dipping* sob três formas de aplicação: imersão, spray e esponja. Na contagem de microrganismos mesófilos foram observadas as seguintes reduções:

de  $2,4 \times 10^4$  UFC/mL para  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL (imersão); de  $1,6 \times 10^{12}$  UFC/mL para  $4,1 \times 10^4$  UFC/mL (spray) e de  $1,1 \times 10^9$  UFC/mL para  $3,4 \times 10^4$  UFC/mL (esponja).

Fagan *et al.* (2005) verificaram que o *pré-dipping* realizado através de imersão direta dos tetos em solução de hipoclorito de sódio (750 ppm) reduziu a contagem de aeróbios mesófilos de  $6,1 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> para  $3,1 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>, e a de psicrotróficos de  $3,6 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> para  $6,7 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>. Quando os tetos foram lavados com água anteriormente à imersão em hipoclorito de sódio (750 ppm) as reduções observadas foram de  $2,1 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> para  $3,9 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> e de  $2,9 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> para  $5,1 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup> para aeróbios mesófilos e psicrotróficos, respectivamente. Quanto à lavagem dos tetos somente com água, observaram-se reduções para aeróbios mesófilos de  $5,5 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> para  $3,8 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> e para psicrotróficos de  $5,5 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> para  $2,1 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>.

Gibson *et al.* (2008) concluíram em seu trabalho que não houve diferença estatística na redução da contagem bacteriana total entre os métodos de limpeza a seco, lavagem com água seguida de secagem e imersão em solução à base de cloro (150 ppm) por 15 segundos seguida de secagem no *pré-dipping* de tetos de vacas leiteiras. Porém, na lavagem dos tetos com solução à base de cloro (150 ppm) seguida de secagem, foi percebida uma redução significativa de 0,89 ciclos logarítmicos comparada aos outros três métodos. Concluiu-se que o processo mecânico da lavagem potencializa a redução de microrganismos.

Brito *et al.* (2000) observaram que houve uma redução média significativa de 2,2 ciclos logarítmicos na contagem total de bactérias na superfície dos tetos de vacas submetidas à *pré-dipping* com imersão em solução à base de iodo (4.000 ppm) seguida de secagem. Já para desinfecção efetuada com toalhas de papel desinfetante contendo etanol, cetrimida, digluconato de clorexidina e água, a redução média significativa foi de 2,4 ciclos logarítmicos.

Wronski *et al.* (2008) avaliaram os efeitos da interação entre os métodos de pré e pós-dipping utilizados em vacas leiteiras com a finalidade de manter a saúde do úbere e concluíram que a sequência que proporcionou as melhores condições de higiene e produtividade foi: 1) descarte do primeiro jato de leite; 2) pré-dipping realizado com toalhas umedecidas com solução desinfetante; 3) pós-dipping também realizado com toalhas umedecidas com solução desinfetante.

Hillerton *et al.* (2007) avaliaram a eficiência de desinfetante a base de cloreto de sódio (UDDERgold Platinum Germicidal Barrier Teat Dip: UG Pt, Ecolab Inc., Redmond, WA) na prevenção de infecções intramamárias em vacas lactantes em comparação a desinfetante a base de iodo (Iosan, Novartis Animal Health, Ltd., Whittlesford, UK). Foram utilizadas 348 vacas, das quais 176 tiveram os tetos desinfetados com desinfetante à base de cloreto de sódio após a ordenha e 172 tiveram os tetos higienizados com desinfetante à base de iodo durante 116 dias e sobre diferentes condições climáticas. Os resultados mostraram que a probabilidade de instalação de uma infecção intramamária nos tetos, posteriormente à utilização correta do desinfetante, é baixa, para ambos os desinfetantes avaliados. Não foi observado nenhum efeito deletério nas condições dos tetos, nem limitações do uso dos desinfetantes em vacas ou por parte dos funcionários.

Arcuri *et al.* (2006) constataram que há relação entre a contagem bacteriana padrão e a aplicação dos produtos de limpeza, tanto no equipamento de ordenha quanto no tanque de estocagem do leite em propriedades rurais dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Os resultados obtidos da contagem bacteriana padrão de até  $1,0 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> estavam associados a métodos adequados de higienização, em que se utilizaram todos os produtos de limpeza recomendados: detergentes ácidos e alcalinos e sanitizante. As contagens acima de  $5,0 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> associavam-se ao emprego de apenas um ou nenhum desses produtos na higienização dos equipamentos.

## 1.5 Queijo Minas Frescal

A produção de queijos é uma atividade antiga, com relatos de consumo de leite solidificado há cerca de 7.000 anos a.C (PERRY, 2004). Acredita-se que sua origem vem de costumes mediterrâneos de guardar leite em sacos de couro de peles de animais ou estômagos de bezeros (CAMPOS, 2001). Segundo Fox *et al.* (2000) o queijo é um nome genérico utilizado para um grupo de alimentos que são fermentados à base de leite com diversidade de sabor, textura e formas.

Na legislação brasileira (BRASIL, 1952) queijo é definido como o produto lácteo fresco ou maturado, que se obtêm por separação parcial do soro em relação ao leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação do coalho, enzimas específicas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias ou especiarias ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes, no qual a relação proteínas do soro/caseína não exceda a do leite.

O queijo minas frescal, produto genuinamente brasileiro, teve sua fabricação iniciada no século XVIII, no estado de Minas Gerais (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS- EPAMIG, 1987; CAMPOS, 2001). É um queijo irregular, tendo em vista não apresentar, de forma definida, suas propriedades de consistência, textura, sabor, durabilidade, rendimento e composição físico-química, uma vez não ter sido consolidada uma padronização.

Em 2004 o Brasil produziu cerca de 445.000 toneladas de queijos. Destes, aproximadamente 29.000 toneladas corresponderam à produção da variedade Minas Frescal, sendo assim um dos queijos mais produzido no país (EMBRAPA, 2011). Suas principais características são sabor agradável e ligeiramente ácido, de aroma leve e delicado. Este queijo é do tipo fresco, de alta umidade e pH maior que 5,0. Estas características somadas à manipulação

durante a fabricação tornam-no um meio propício à contaminações microbiológicas e reações bioquímicas.

A massa do queijo minas frescal é crua, com alto teor de umidade (46-55%) e não maturada, devendo ser consumido até quinze dias após sua fabricação, em virtude de ser altamente perecível (HOFMAN *et al.*, 2002).

Para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o queijo minas frescal é um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, completada ou não com ação de bactérias lácticas específicas, sendo classificado como um queijo semigordo, de alta umidade, devendo ser consumido fresco, com consistência branda e macia, com ou sem olhaduras mecânicas, de sabor suave a levemente ácido, sem ou com crosta fina, de forma cilíndrica e com peso de 0,3 a 5kg (BRASIL, 1997). Em 2004 o MAPA realizou a correção da classificação da umidade do queijo Minas Frescal, considerando-o como um queijo de muito alta umidade (>55%) (BRASIL, 2004).

Os queijos de massa mole com pH alto e umidade elevada permitem o desenvolvimento de muitos microrganismos. O queijo Minas frescal não é padronizado e sua composição é variável: apresenta de 12 a 18% de proteína; gordura de 20,5% até 29,22%. Durante a fabricação do queijo Minas podem ocorrer perigos que irão comprometer o produto final, dentre eles destacam-se: alta contaminação microbiológica da matéria-prima, recontaminação do leite pós-pasteurizado, temperaturas inadequadas de fabricação e de armazenamento. Assim, as boas práticas de fabricação e as medidas de sanificação durante o processamento são cruciais para a garantia de um produto de qualidade (SANGALETTI *et al.*, 2009).

Conforme portaria nº 146 (BRASIL, 1996A), as tolerâncias para os padrões microbiológicos vigentes do queijo minas frescal (de muita alta umidade) devem ter, para amostras representativas,  $1 \times 10^3$  UFC (Unidades Formadoras de Colônia) para coliformes a 35°C/g,  $5 \times 10^2$  UFC para coliformes termotolerantes/g,

*Staphylococcus* coagulase positiva/g,  $5 \times 10^3$  de bolores e leveduras/g e ausência de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em 25g. Para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) as tolerâncias são de  $5 \times 10^2$  UFC de coliformes de origem fecal/g e *Staphylococcus* coagulase positiva/g, e ausência em 25g de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* (Brasil, 2001).

Com relação à estabilidade, o queijo minas frescal apresenta um fator agravante, pois, além de ser um produto fresco com alto conteúdo de umidade, não é submetido à cura e apresenta baixa quantidade de sal. Estas características geram condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos, e, quando somadas à manipulação inadequada durante a fabricação, tornam o produto um meio propício para problemas de segurança alimentar, além da consequente diminuição de sua vida de prateleira (CARVALHO, 2003).

Diversos relatos indicam que queijos do tipo minas frescal comercializados no Brasil são amplamente contaminados. Araújo *et al.* (1997) observaram que 100% das amostras de queijo minas frescal analisadas, obtidas em supermercados e padarias localizadas na cidade do Rio de Janeiro, revelaram a presença de coliformes fecais em níveis acima dos tolerados. Oliveira *et al.* (1998) relataram a detecção de coliformes a 35°C e 45°C acima dos permitidos, respectivamente, em 46,9% e 9,4% das amostras de queijo minas elaboradas por seis fábricas de laticínios localizadas na região nordeste do estado de São Paulo. Pereira *et al.* (1999) observaram, em Belo Horizonte, que 90% das amostras de queijo-de-minas frescal analisadas no período de 1995-96 apresentaram coliformes fecais acima dos limites estabelecidos por lei.

De seis marcas coletadas em supermercados de Piracicaba, SP, com registro no SIF, Sangaletti *et al.* (2009) enquadraram apenas uma delas como própria para consumo, a qual foi submetida ao estudo de vida útil. As outras cinco marcas (83,33%) apresentaram contagens de *Escherichia coli* acima de  $2,4 \times 10^3$  NMP.g<sup>-1</sup>. Como essa bactéria pertence ao grupo dos coliformes fecais e esse valor está

acima do permitido pela legislação vigente (BRASIL, 2001), esses lotes foram considerados impróprios para o consumo. Isso não é incomum, pois Lisita (2005) analisou queijos Minas no final da produção em um laticínio com SIF e detectou amostras já condenadas antes da comercialização, com contagem de  $1,1 \times 10^8$  NMP.g<sup>-1</sup> de coliformes fecais. Os resultados obtidos nestes trabalhos reforçam a necessidade de aplicação de boas práticas higiênicas na produção do queijo Minas, bem como opções de tratamentos sanitizantes para evitar esse tipo de problema.

A maior contagem encontrada Sangaletti et al (2009) em amostras de queijo minas obtidos imediatamente após a produção em indústria de laticínios localizada em Piracicaba-SP e controlados rigorosamente a temperatura de 4°C, foi de  $1,7 \times 10^4$  NMP.g<sup>-1</sup> de E. coli, após 30 dias da produção, enquadrando-se, desta forma, como impróprio para o consumo conforme Resolução Colegiada (RDC) nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2001). A contagem dos estafilococos coagulase positiva permaneceu com  $<10,0$  UFC.g<sup>-1</sup> e a Salmonella sp. foi ausente em 25 g durante todo o período em todas as amostras.

Com relação à vida de prateleira de queijo minas frescal, Sangaletti et al (2009) verificaram que, mesmo sob refrigeração rigidamente controlada de 4°C, as bactérias mesófilas apresentaram um crescimento gradativo em média de 7,72 log UFC.g<sup>-1</sup> entre o 1º e 30º dia no queijo armazenado, enquanto que as bactérias lácteas, durante o mesmo período, apresentaram população inicial de 3,48 e 9,53 log UFC.g<sup>-1</sup> no 30º dia com crescimento médio final de 6,56 log UFC.g<sup>-1</sup>, mostrando um aumento de 6,05 log UFC.g<sup>-1</sup> entre o 1º e o 30º dia. A contagem dos microrganismos mesófilos tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo idéia sobre seu tempo útil de conservação (JAY, 1996).

Rocha, Buriti e Saad (2006) avaliaram o comportamento das bactérias lácticas em queijo Minas frescal de sete diferentes marcas durante a vida de prateleira por 21 dias, quando seis marcas apresentaram uma população média

final de aproximadamente  $8,0 \log \text{UFC.g}^{-1}$  e não apresentaram crescimento com o passar dos dias.

A presença das bactérias lácticas pode ter sua origem no leite destinado à produção do queijo ou pela adição de cultura láctica durante o processamento do produto. O seu crescimento ocasiona o aumento da acidez pelo fato de fermentarem a lactose e formarem ácido láctico. As bactérias lácticas são responsáveis pelas transformações bioquímicas de lipídios e proteínas em diferentes compostos desenvolvendo *flavor*, caracterizando o produto final quanto ao sabor, aroma e textura (ESKIN, 1990).

## **1.6 Ozônio**

### **1.6.1 Histórico**

A necessidade de um antimicrobiano potente, assim como tratamentos alternativos para redução da contaminação de alimentos, aumentou nos últimos anos. A indústria alimentícia vem pesquisando desinfetantes que sejam efetivos contra patógenos e seguros para o uso em suas plantas de processamento. Um dos agentes promissores é o ozônio que está sendo utilizado como sanitizante no tratamento de águas na Europa desde o início do século XX (KIM *et al.*, 1999B).

O ozônio é um forte agente antimicrobiano com alta reatividade e decomposição espontânea em produtos não tóxicos. Pode ser aplicado em alimentos na forma líquida e gasosa. O ozônio molecular ou seus produtos de decomposição inativam microrganismos rapidamente, reagindo com elementos vitais da célula, como enzimas intracelulares, ácidos nucleicos e membranas celulares. O seu uso combinado a outros processos para diminuição da carga microbiana resulta em um sinergismo, sendo utilizado em muitos casos. O ozônio é adequado para descontaminar produtos alimentícios, equipamentos, ambientes, superfícies que entram em contato com alimentos, tratamento de água e efluentes (KIM *et al.*, 1999A; KHADRE *et al.*, 2001B).

Em 1785, Van Marum, filósofo alemão, observou as características eletrostáticas do ar devido ao ozônio. Schombein, em 1801, reportou o odor característico como sendo uma nova substância, de nome ozônio, e sugeriu que o gás ocorreria naturalmente na atmosfera. Na Alemanha em 1875, Siemens criou o primeiro gerador de ozônio – ozonizador. Em 1891, verificou-se que o ozônio era capaz de destruir bactérias presentes na água. O primeiro experimento utilizando ozônio no tratamento da água foi realizado em 1893, em Leyde, na Holanda, no tratamento das águas do rio Reno. Uma planta geradora de ozônio para tratamento de água em grande escala foi construída na Alemanha em 1902. Em 1906, em Nice, na França, realizou-se o primeiro tratamento de vegetais com água ozonizada, em escala industrial (YANG & CHEN, 1979).

Em 1982, o *Food and Drug Administration* (FDA) declarou a ozonização de água engarrafada como segura, integrando a lista de produtos “*Generally Recognized as Safe*” (GRAS) (U.S. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION, 1982). Por volta de 1987, mais de 200 “plantas” de tratamento de água potável nos Estados Unidos estavam utilizando ozônio. Em 1997, o ozônio foi reconhecido pelo FDA como sendo um sanitizante apto para ser usado na indústria alimentícia conjuntamente com as Boas Práticas de Fabricação (BPF), passando a ser reconhecido como GRAS (GRAHAM, 1997).

No Japão se tem mais de 500 estações de tratamento de água e mais de 100.000 plantas de processamento de alimentos que utilizam o ozônio em seus processos (NAITO & TAKAHARA, 2006), o que reforça a sua eficiência e atuação.

### **1.6.2 Definição**

O ozônio é uma modificação alotrópica do  $O_2$  e é formado por três átomos de oxigênio ( $O_3$ ) arranjados em um ângulo obtuso de  $116^{\circ}49'$ , em que o átomo central de oxigênio está equidistante dos outros dois por ligações de 1.278 Å (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004). É um gás instável, principalmente em temperaturas elevadas, tóxico, de baixa solubilidade em água (0,494 v/v de água),

de coloração azul quando se encontra condensado (-112° C) e violeta-escuro quando congelado (-193°C) (LIEBERGOTT *et al.*, 1992). O potencial de oxidação do ozônio é alto (-2,07V) comparado ao ácido hipocloroso (-1,49V) ou o cloro (1,36V), ficando abaixo somente do flúor. Apresenta maior estabilidade em solução diretamente proporcional ao aumento da acidez da água (KIM *et al.*, 1999B; DOSTI *et al.*, 2005).

Dentre as características físico-químicas, pode-se citar, segundo Kechinski (2007):

- massa molar: 48 kg/kmol;
- ponto de fusão (a 1 atm) -192,5°C;
- ponto de ebulição (a 1 atm): -111,9°C;
- massa específica do gás (nas CNTP) 2,4g.L<sup>-1</sup>;
- quantidade considerada segura para o organismo humano: 0,1ppm.

Quando na forma líquida, o ozônio é explosivo se a sua concentração for superior a 20% em uma mistura com oxigênio. As explosões podem ser causadas por faíscas elétricas ou por mudanças bruscas de pressão e temperatura. O ozônio pode ser detectado pelo homem já em baixas concentrações (0,02 mg.L<sup>-1</sup>) e uma exposição prolongada a uma concentração de 1.000 g.L<sup>-1</sup>, ou maior, pode ser letal (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004).

### **1.6.3 Geração**

A formação do ozônio ocorre naturalmente na estratosfera em pequenas quantidades (0,005 mg.L<sup>-1</sup>) pela ação da irradiação solar ultravioleta no oxigênio. Uma pequena quantidade de ozônio também é formada na troposfera como subproduto de reações fotoquímicas de hidrocarbonetos, oxigênio e nitrogênio (KIM & YOUSEF, 2000B). Quando utilizado na indústria é geralmente gerado em sistemas fechados, sendo produzido em baixas concentrações (0,003

mg.L<sup>-1</sup>) pelo oxigênio atmosférico ou pela radiação de 185 nm de comprimento de onda emitida por lâmpadas UV (KIM *et al.*, 1999B).

Guzel-Seydim (2004) explica que para gerar o ozônio deve ocorrer uma ruptura na molécula do oxigênio diatômico, formando dois fragmentos de oxigênio que podem reagir com outras moléculas também de oxigênio e formar a molécula de O<sub>3</sub>. No método de descarga corona há dois eletrodos formando um vão entre eles. Um eletrodo de alta tensão e outro de baixa tensão. Segundo Kim *et al.* (1999B), uma corrente alternada com alta voltagem é aplicada através deste vão na presença de ar atmosférico ou oxigênio. Ocorre a excitação dos elétrons do oxigênio e assim induz a quebra das moléculas de O<sub>2</sub>. Os átomos quebrados combinam-se com outras moléculas de oxigênio diatômico para formar o ozônio. A produção de ozônio varia, dependendo da voltagem, da frequência da corrente, do vão de descarga elétrica e da pressão absoluta no interior do vão. O método de descarga corona tem sido largamente utilizado para produzir grandes quantidades de ozônio.

No processo eletroquímico a água é quebrada em átomos de hidrogênio e oxigênio por eletrólise. As moléculas de hidrogênio são separadas da mistura de gás e água e os átomos de oxigênio são combinados para formar ozônio e oxigênio diatômico. Este sistema produz ozônio à concentrações de 3 a 4 vezes maior (10 a 18% de ozônio na mistura gasosa) que pelo método de descarga corona (KIM *et al.*, 1999B).

#### **1.6.4 Eficácia**

Embora a eficácia do ozônio varie de microrganismo para microrganismo, seu estado fisiológico e os fatores ambientais afetam significativamente o grau de inativação destes pelo ozônio. A susceptibilidade dos microrganismos ao ozônio varia de acordo com o pH do meio, temperatura, e a quantidade de matéria orgânica em torno das células (KIM *et al.*, 1999A).

Ozônio tem sido utilizado com êxito na inativação da microflora de carnes, aves, peixes, frutas e hortaliças. A FDA recentemente aprovou o uso de ozônio nas fases aquosas ou gasosas como um agente para tratamento, estocagem e processo de alimentos (SHARMA & DEMIRCI, 2003).

A suscetibilidade de microrganismos ao ozônio varia de acordo com o estado fisiológico das células, pH do meio, temperatura, umidade e a presença de aditivos, como ácidos, surfactantes e açúcares. Concentrações relativamente baixas de ozônio e um curto contato de tempo são suficientes para inativar suspensões puras de bactérias, mofos, leveduras, parasitas e vírus (KIM *et al.*, 1999B).

A taxa de destruição de microrganismos por desinfetantes geralmente cresce com o aumento da temperatura. De acordo com a teoria de van't Hoff-Arrhenius, a temperatura determina parcialmente a taxa com que o desinfetante se difunde através da superfície dos microrganismos e também a taxa de reação com o substrato. Em experimentos com ozônio percebe-se, que com a elevação da temperatura sua solubilidade e estabilidade diminuem, porém a taxa de reação com o substrato aumenta (KHADRE *et al.*, 2001A).

Achen e Yousef (2001) trataram com ozônio maçãs contaminadas com *Escherichia coli* nas temperaturas de 4, 22 e 45°C, e observaram que as contagens bacterianas superficiais diminuíram 3,3; 3,7 e 3,4 unidades logarítmicas, respectivamente. Análises estatísticas demonstraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). A concentração de ozônio residual foi maior no ensaio com menor temperatura (4°C) e decaiu conforme se aumentava a temperatura. O aumento da reatividade do ozônio compensou o decaimento da sua estabilidade e, portanto, nenhuma mudança significativa foi observada em relação a sua eficácia. Kim *et al.* (1999B) observou que o ozônio foi mais eficiente na destruição de contaminantes microbianos quando aplicado a temperaturas maiores que a de refrigeração.

O ozônio é mais estável a baixo do que a elevado valor de pH. A inativação de microrganismos ocorre em grande parte através de reações com ozônio molecular quando o pH é baixo. Em elevados valores de pH o ozônio se decompõe e os radicais resultantes contribuem para sua eficácia (KHADRE *et al.*, 2001 B).

Khadre *et al.* (2001A) adicionou água ozonizada, com diferentes concentrações, em uma solução tampão de fosfato (0,01 M) nas faixas de 5,0 a 9,0 de pH, misturou por 15 s e mediu a concentração residual de O<sub>3</sub>. A estabilidade do ozônio em solução foi melhor em pH 5,0. A estabilidade do ozônio decresce quando o pH aumenta, e não foi encontrado ozônio residual na solução com pH 9,0.

Sehested *et al.* (1992) estudaram a decomposição do ozônio em soluções aquosas de ácido acético em função de diferentes valores de pH. A taxa de decomposição do O<sub>3</sub> em soluções saturadas de ácido acético (0,1 M) é praticamente constante nas faixas de pH de 0-3. Acima do pH 3 esta taxa é aumentada com o aumento do pH.

Carvalho *et al.* (2006B) informam que o branqueamento de polpa kraft da indústria de celulose com ozônio deve ser efetuado em pH na faixa de 2,5-3,0, já que em valores acima destes ocorre significativa decomposição do ozônio, catalisada por íons OH<sup>-</sup>, o que resulta em perda de eficiência e seletividade do reagente. A perda da eficiência deriva das perdas do ozônio e a perda de seletividade do ataque aos carboidratos pelos radicais livres (OOH, OH) provenientes da decomposição do ozônio.

A presença de substâncias orgânicas com alta demanda de ozônio pode fazer com que haja uma competição com os microrganismos pelo O<sub>3</sub>. A presença de matéria orgânica na água destinada ao processamento de alimentos com ozônio é altamente indesejável. Além disso, sub-produtos indesejados da ação do ozônio sobre os compostos orgânicos podem diminuir a vida-de-prateleira

(*shelf life*), alterar características sensoriais, ou colocar em risco a segurança do produto final (KHADRE *et al.*, 2001B).

A pureza e o pH da água afetam a solubilidade do ozônio em água. Kim (1998) borbulhou ozônio em água duplamente destilada, em água deionizada e em água de torneira com os pH de, respectivamente, 5,6; 5,9 e 8,23. O autor observou que o alto pH da água de torneira pode ter desestabilizado o ozônio e a taxa de solubilização diminuiu. Observou-se, também, que a matéria orgânica existente na água de torneira consumiu o ozônio.

#### **1.6.5 Mecanismo de ação**

O ozônio é um dos mais potentes agentes oxidantes e sanitizantes e tem sido usado como substituto de produtos químicos à base de cloro (KIM; YOUSEF, 2000; KHADRE *et al.*, 2001B). Seo *et al.* (2007) demonstraram que o tratamento de quitosana com gás ozônio (12 % em peso) durante 20 minutos resultou numa perda de peso de 92% quando comparada à amostra controle, mostrando que o O<sub>3</sub> pode ser usado na degradação de macromoléculas.

Por não permanecer na água por um longo período de tempo, devido a sua decomposição rápida em oxigênio, o uso do ozônio não deixa resíduos nos alimentos (KHADRE *et al.*, 2001B). Ou seja, o ozônio pode ser usado com segurança, sem preocupações a respeito do consumo de seus resíduos (SEO *et al.*, 2007).

A ação do ozônio na inativação de microrganismos se dá pela progressiva oxidação dos componentes vitais da célula, e essa ação ocorre por meio de dois mecanismos. O primeiro mecanismo é que o ozônio oxida os grupos sulfidrilas e os aminoácidos das enzimas, peptídeos e proteínas em peptídeos menores. O segundo mecanismo consiste na oxidação de ácidos graxos polinsaturados em peróxi-ácidos. A degradação pelo ozônio de lipídeos insaturados na membrana celular resulta na ruptura da célula e,

conseqüentemente, vazamento do conteúdo celular. As duplas ligações de lipídeos insaturados são particularmente vulneráveis aos ataques do ozônio. Em bactérias Gram-negativas as camadas de lipoproteínas e lipo-polissacarídeos são o primeiro local da destruição, resultando no aumento da permeabilidade celular e, eventualmente, a quebra celular (KIM *et al.*, 1999B).

Além disso, foi verificado que as bactérias Gram-negativas são mais sensíveis ao ataque do ozônio, porque o N-acetil glicosamina, um composto presente no peptídeoglicano das células bacterianas e na cápsula dos vírus, é resistente ao ozônio. Desta forma bactérias Gram-positivas podem formar até 20 camadas desse composto em sua parede celular, enquanto as Gram-negativas formam apenas 1 ou 2 (KHADRE *et al.*, 2001A).

Segundo Nascimento *et al.* (2008), o ozônio tem efeito dispersante em microrganismos agrupados e aderidos a superfícies de alimentos, causando um aumento virtual no número dos mesmos, além disso, degrada a matéria orgânica presente em compostos de baixo peso molecular. Os autores atribuíram a tais efeitos os valores oscilantes na contagem de microrganismos ao se tratar café despolpado com ozônio aquoso (3,5 mg.L<sup>-1</sup>;60 min) e ultra-som.

Kosekie Isobe (2006) examinaram o efeito da água ozonizada sobre o controle microbiológico de alfaces americano (*Lactuca sativa*L.) e constataram que o tratamento combinado de água quente (50°C; 2,5 minutos) seguido de água ozonizada (5 ppm; 2,5 minutos) teve o mesmo efeito bactericida do tratamento efetuado somente com água ozonizada em temperatura ambiente (5 ppm; 2,5 minutos), reduzindo o número de bactérias de 1,2 para 1,4 ciclos logarítmicos. Foi observado um decréscimo da população de aeróbios mesófilos, de 5,7 para 4,2 ciclos logarítmicos, com o aumento da concentração do ozônio adicionado de 0 para 10 ppm. Os autores frisam que a alface, mesmo tratada com sanitizantes, deve ser mantida em baixas temperaturas (inferiores a 10°C) para controlar o crescimento microbiano durante a distribuição. Cavalcante (2007) avaliou a

inativação de *Escherichia coli*O157:H7 inoculada em alface americana por meio de tratamento com água ozonizada ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) por 1 minuto e constatou uma redução média de 3,2 ciclos logarítmicos.

NADAS *et al.* (2003) verificaram que a estocagem de morangos por 3 dias a  $2^{\circ}\text{C}$  em ar ozonizado ( $1,5 \text{ }\mu\text{L/L}$ ) fez com que o desenvolvimento micelial de *Botrytis cinerea* inoculado no ar fosse menor do que nos morangos armazenados sem a presença do ozônio. Já Bialka e Demirci (2007B), conseguiram uma redução de 2,60 e 2,96 ciclos logarítmicos, utilizando 64 minutos de exposição contínua (5%wt/wt) seguido de 64 minutos de ozônio pressurizado (83 kPa), para *Salmonella* e *E. coli* O157:H7, respectivamente, inoculadas artificialmente em morangos

AL-HADDAD *et al.* (2005) inocularam *Salmonella infantis* e *Pseudomonas aeruginosa* em peitos de frango refrigerados e expuseram estes a altas concentrações de gás ozônio ( $> 2000 \text{ ppm}$ ) por mais de 30 minutos, obteve uma redução de 97% na contagem de *S. infantis* e 95% de *P. aeruginosa*.

Em materiais de embalagem de alimentos e aço inoxidável, Khadree & Yousef (2001) atingiram a esterilidade de material multilaminado, após tratamento com água ozonizada ( $5,9 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ), durante 1 minuto. Filmes secos de esporos de *Bacillus subtilis* foram eliminados dos materiais multilaminados com  $13 \text{ }\mu\text{g/mL}$  de ozônio em água e com  $8 \text{ }\mu\text{g/mL}$  em aço inoxidável.

Rodriguez-Romo e Yousef (2005) efetuaram a sanitização de cascas de ovos contaminados com *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* por tratamentos com ozônio a  $4-8^{\circ}\text{C}$  a 1atm durante 10 minutos, obtendo uma redução de 5,9 ciclos logarítmicos, comparada à amostra controle não tratada.

Novake Yuan (2004) conseguiram uma redução de células vegetativas de *Clostridium perfringens* na superfície de bifes industrializados de 5,59 para 3,50

ciclos logarítmicos após combinar tratamentos com água ozonizada (5 ppm) e posterior aquecimento a 55°C.

BARTH *et al.*, (1995) verificaram o efeito da estocagem de amoras sob ozônio em relação ao conteúdo de antocianinas e crescimento de fungos. As amoras foram colhidas e estocadas por 12 dias, a 2°C, nas concentrações 0,0; 0,1 e 0,3mg L<sup>-1</sup> de ozônio. A estocagem em câmara com ozônio suprimiu o crescimento fúngico durante os 12 dias, enquanto na estocagem sem o gás, apenas 20% das frutas apresentaram decaimento. O conteúdo de antocianina foi similar ao inicial em todos os tratamentos.

Na estocagem de caqui a 15°C por 30 dias a uma concentração de 0,15 ppm de ozônio e 90% de umidade relativa. Foi observado que no armazenamento sob ozônio os caquis não apresentaram alteração de cor, pH e sólidos solúveis totais, além da sua firmeza ser mantida por mais tempo que o limite comercial, aumentando sua vida de prateleira (SALVADOR *et al.*, 2006).

O uso de ozônio e outros tratamentos alternativos para a conservação de mamão papaia (*Caraica papaya L.*) foram avaliados por (KECHINSKI, 2007). O objetivo do estudo foi eliminar a antracnose (*Colletotrichum gloesporioides Penz*) em amostras de mamão papaia armazenados em câmaras ozonizadas em concentrações de 0 a 0,5 ppm de ozônio, avaliar a sanitização superficial desse fruto através de imersão em água ozonizada em concentrações de 0 a 4 ppm de ozônio durante 30 e 60 segundos. O uso de ozônio nas concentrações de 0,2 e 0,5 ppm, em câmara ozonizada, resultou em manchas nas cascas dos frutos por possível oxidação de componentes da parede celular. Foi observado que a imersão das frutas em água ozonizada em concentrações de 1 a 4 ppm não foi efetiva na eliminação da antracnose, razão pela qual foi necessário o uso do tratamento hidrotérmico prévio ao uso do ozônio, sendo que os melhores resultados obtidos foram em temperaturas próximas a 55°C por 1 minuto. Observou-se também que o aumento da concentração de ozônio de 2 para 4 ppm

proporcionou uma perda de mais de 40% do teor de vitamina C dos frutos, contudo não alterou o grau de maturação (ratio) e cor dos mesmos.

Selma *et al.* (2008B) investigaram a eficácia do ozônio gasoso, aplicado sob vácuo parcial em um ambiente controlado, para a eliminação da *Salmonella* inoculado em casca de melão, concluíram deste estudo que o ozônio gasoso é uma opção eficaz para a redução de riscos de contaminação e deterioração de melão doce e fresco cortado.

Assim, diante de tudo que foi apresentado, pode-se concluir que o ozônio é um ótimo agente desinfetante, além de não deixar resíduos. Por estas vantagens o ozônio tem sido bastante empregado no setor de alimentos. Na tabela 1.1 encontram-se alguns trabalhos que utilizam tratamento por ozônio.

**Tabela 1.1 – Aplicações diversas do ozônio na indústria alimentícia.**

Produto	Objetivo	Método de Aplicação	Concentração	Tempo de Tratamento	Microorganismo	Redução Observada	Referências
Pimentão	Redução microbiana	Imersão	0,3 - 3,95 mg/L	20 s - 30 min	Aeróbios Totais	0,72 ciclos log	KETTERINGHAM et al, 2006
Cogumelos	Efeito nas propriedades físico-químicas	Gás	100 mg/h	0 - 30 min	-	-	ESCRICHE et al, 2001
Material de embalagem	Descontaminação	Água ozonizada	5,1 µg/mL	1 min	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,4 ciclos log	KHADRE & YOUSEF, 2001
Peixe	Conservação	Água ozonizada	2 ppm	-	Mesófilos Totais	1,5 ciclos log	PASTORIZA et al, 2007
Frango	Controle microbiológico	Gás	> 2000 ppm	15 e 30 min	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95%	AL-HADDAD et al, 2005
Frutas	Redução microbiana	Gás	5 ppm	45 min	Coliformes Totais	3,1 ciclos log	NAJAFI & KHODAPARAST, 2008
Quitosana	Despigmentação	Gás	12% wt	0 - 20 min	-	-	SEO et al, 2007
Vegetais	Remoção de pesticidas	Água ozonizada	1,4 mg/L	5 - 15 min	-	-	WU et al, 2007
Galões de Água	Sanificação	Água ozonizada	4 mg/L	2 min	Aeróbios mesófilos	5,7 UFC/cm <sup>2</sup>	CARDOSO et al, 2003
Salmão	Inativação de microorganismo	Gás	0,1x 10 <sup>-3</sup> g/L	20 min	Aeróbios totais	1,0 ciclo log	VAZ-VELHO et al, 2006
Alface	Redução microbiana	Água ozonizada	1,0 mg/L	3 min	Aeróbios mesófilos	4,07 ciclos log	CAVALCANTE, 2007

### 1.6.6 Tratamentos combinados

Os processos de oxidação avançada (POAs) são processos designados para gerar intermediários altamente reativos, particularmente o radical hidroxila (OH), que é menos seletivo e mais potente oxidante do que o ozônio molecular,

para oxidar material orgânico. Ozonização utilizando altos valores de pH, processos com  $H_2O_2/O_3$ , fotólise por luz UV e ozonização catalítica são exemplos de POAs (KHADRE *et al.*, 2001B; LEGUBE; LEITNER, 1999).

Khadre *et al.* (2001B) demonstraram que ozônio, a um pH 11,5 foi mais efetivo, que a combinação  $H_2O_2/O_3$  a um pH 7,5 na descoloração de águas residuais e na remoção de compostos orgânicos dissolvidos.

O peróxido de hidrogênio em soluções aquosas dissocia-se parcialmente no ânion hidroperóxido ( $HO_2^-$ ) que é altamente reativo com ozônio. Pequenas concentrações de  $H_2O_2$  podem ser efetivas na iniciação da decomposição do ozônio (KHADRE *et al.*, 2001B; LEGUBE; LEITNER, 1999).

Selma *et al.* (2008A) verificaram a eficácia da desinfecção de cebola, espinafre, cenoura e escarola por ozônio, iluminação UV e pela combinação de ambos. Após 60 minutos de tratamento, a redução de mesófilos totais conseguidas pelo tratamento com  $O_3$ -UV foi de 1,6-2,6 ciclos logarítmicos, maior que pelo tratamento com UV.

A ozonização catalítica baseia-se no princípio da ativação do ozônio por inúmeros metais (Fe, Mn, Ni, Co, Zn, Ag, Cr) em solução ou por catálise heterogênea com metais sob variadas formas (sal de metal reduzido, óxido sólido, metal depositado sobre um suporte). Estes metais aumentam a eficácia do ozônio na remoção (ou na conversão) de diferentes compostos orgânicos em solução aquosa (LEGUBE; LEITNER, 1999).

Ao combinar o ozônio com o cloro consegue-se um efeito sinergista que potencializa a ação de ambos, já que o cloro não altera a permeabilidade de membranas como faz o ozônio. Khadre *et al.* (2000A) mostraram que o cloro livre foi ineficiente contra cistos de *Cryptosporidium parvum*, a menos que seja feito um pré-tratamento com ozônio. Eles assumiram que a pré-ozonização altera a

permeabilidade da membrana dos cistos, o que auxilia na entrada do cloro causando, conseqüentemente, a sua inativação.

### **1.6.7 Toxicidade e Legislação**

A toxicidade é um critério de extrema importância para aprovar o ozônio no processamento de alimentos. Os efeitos primários do ozônio em humanos estão relacionados com o trato respiratório. Sintomas de toxicidade incluem dor de cabeça, tontura, sensação de ardência nos olhos e garganta, sensação de odor pungente e tosse. Em baixas concentrações o ozônio não é um gás extremamente tóxico, mas em altas concentrações pode ser letal (RUSSEL et al, 1999).

A aspiração direta do ozônio é extremamente perigosa, por sua alta toxicidade ao ser humano. No entanto, a ingestão por intermédio de água ozonizada não apresenta perigo sério, pois a meia-vida do ozônio dissolvido na água é relativamente curta (LAPOLLI et al., 2003). A inalação acidental do ozônio causa respiração acelerada, sendo que o grau dependerá do conteúdo inalado e do tempo de exposição ao ozônio. O paciente deve descansar imediatamente após o acidente para reduzir o efeito de sufocação, que é causado pela irritação do trato respiratório, devendo ser levado ao hospital o mais rápido possível (LANGLAIS et al, 1991).

Uma concentração de ozônio da ordem de 0,1 mg/L pode causar irritação ao nariz, garganta e olhos. Pesquisadores alegam que concentrações de ozônio de 0,02 a 0,04 mg/L podem ser detectadas pelo ser humano e que a exposição prolongada a concentrações iguais ou superiores a 1,0 mg/L pode causar a morte. Uma exposição de uma hora a concentrações de 2, 4, 15 e 95 mg/L pode causar efeitos sintomáticos, irritantes, tóxicos e letais, respectivamente. Os efeitos tóxicos do ozônio pela inalação são manifestados nos pulmões. Uma variedade de danos extra-pulmonares também podem ser resultado da ação do ozônio e de seus produtos (KIM; YOUSEF; DAVE, 1999).

Como o ozônio se torna um gás tóxico acima de certas concentrações, limites máximos de exposição são definidos e as pessoas que trabalham em plantas de ozonização devem ser submetidas a revisões médicas regulares. Os limites de referência para a exposição humana ao ozônio que foram estabelecidos por alguns órgãos regulamentadores norte-americanos são apresentados na Tabela 1.2 (LANGLAIS et al, 1991).

No Brasil, os limites de tolerância de ozônio em até 48 horas de trabalho por semana são de 0,08 mL/m<sup>3</sup> ou de 0,16 mg/m<sup>3</sup>, segundo a NR 15 da Portaria MTB nº 3.214, de 08 de junho de 1978, que aprova as Normas Regulamentadoras - NR - do Capítulo V, Título II, da Consolidação das Leis do Trabalho, relativas à Segurança e Medicina do Trabalho, (BRASIL, 1978).

**Tabela 1.2** – Níveis e tempo de exposição de Ozônio previstos em Organizações Mundiais.

<b>Organizações</b>	<b>Níveis de Exposição</b>	<b>Tempo de Exposição</b>
OSHA - Occupational Safety and Health Administration	máximo de 0,1 mg/L	8 horas/dia
ANSI/ASTM - American National Standards Institute/American Society for Testing Materials	média de 0,1 mg/L	8 horas/dia
ACGIH - American Conference of Government Industrial Hygienists	máximo de 0,3 mg/L	10 minutos/dia
American Industrial Hygiene Association	máximo de 0,1 mg/L	8 horas/dia
Ministério do Trabalho - Brasil	0,08 mL/m <sup>3</sup> ou de 0,16 mg/m <sup>3</sup>	48 horas/semana

## 1.7 Referências Bibliográficas

ABPL, Associação Brasileira dos Produtores de Leite - Leite Brasil. **O leite nos últimos 10 anos**. Disponível em: <[http://www.leitebrasil.org.br/artigos/jrubez\\_093.htm](http://www.leitebrasil.org.br/artigos/jrubez_093.htm)> Acesso em: 20 jan. 2009.

ACHEN, M.; YOUSEF, A. E. Efficacy of Ozone Against *Escherichia coli* O157:H7, on Apples. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 9, p. 1380-1384, 2001.

AJZENTAL, A. Caminhos do leite: da ordenha ao consumidor. **Leite e Derivados**, São Paulo, v.3, n.18, p.29-40, 1994.

AL-HADDAD, K.S.H.; AL-QASSEMI, R.A.S.; ROBINSON, R.K. The use of gaseous ozone and gas packaging to control populations of *Salmonella infantis* and *Pseudomonas aeruginosa* on the skin of chicken portions. **Food Control**, v. 16, n. 5, p. 405-410, 2005.

AMARAL, L.A.; ISA, H.; DIAS, L.T.; ROSSI, O.D.J.; FILHO, A.N. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, 2004.

ARAÚJO, V.S.; SANTOS, E.C.S.; QUEIROZ, M.L.P. *et al.* Análise bacteriológica do queijo-de-minas frescal comercializado na cidade do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19., Rio de Janeiro, 1997. **Anais...** Rio de Janeiro: SBM, 1997, p. 283. (Resumo).

ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicotróficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. 1º ed. Juiz de Fora-MG, Embrapa Gado de Leite, 2003. 168p.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade Microbiológica do Leite Refrigerado nas Fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

BARTH, M.M.; ZHOU, C.; MERCIER, J.; PAYNE, F.A. Ozone Storage Effects on Anthocyanin Content and Fungal Growth in Blackberries. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1286-1288, 1995.

BAUMAN, D.E.; MATHER, I.H.; WALL, R.J.; LOCK, A.L. . Major Advances Associated with the Biosynthesis of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n.4, p. 1235-1243, 2006.

BIALKA, K.L.; DEMIRCI, A. Utilization of Gaseous Ozone for the Decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on Raspberries and Strawberries. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 5, p. 1093-1098, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal** - RIISPOA. Brasília: SDA, 1952. p. 124.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. Portaria nº 146. **Diário Oficial da União** nº 172, Brasília, 11 mar. 1996A.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Resolução RDC nº 145 de 13 dez de 1996. Regulamento técnico MERCOSUL de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal, 1996B.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo minas frescal. Portaria nº352. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 set.1997. Seção I, p.13-68.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. **Portaria MTB nº 3.214, de 08 de junho de 1978**. Aprova as Normas Regulamentadoras - NR - do Capítulo V, Título II, da Consolidação das Leis do Trabalho, relativas à Segurança e Medicina do Trabalho. NR 15 - Atividades e Operações Insalubre - Anexo nº 11, 1978.

BRASIL. Portaria nº 166, de 5 de Maio de 1998. Cria grupo de trabalho para analisar e propor programa e medidas visando ao aumento da competitividade ...**Diário Oficial da União**, Brasília. p.42. Maio, 1998. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União** nº 172, Brasília, 02 jan. 2001.

BRASIL.Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária.**Instrução Normativa nº51**, de 18 de setembro de 2002. Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº4 de 1 de março de 2004. **Diário Oficial da União, Brasília**, 5 mar. 2004. Seção I, p.5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Dispõe sobre os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2006, Seção 1, p. 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Agricultura empresarial**. 2010A. Disponível em: [https://i3gov.planejamento.gov.br/coi/textos/livro2/2.1 Agricultura empresarial.pdf](https://i3gov.planejamento.gov.br/coi/textos/livro2/2.1_Agricultura_empresarial.pdf). Acessado em: 13 jan. 2011.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA).**Efetivo nacional de bovinos cresce 1,5% em 2009**.2010B. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=1761&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1761&id_pagina=1). Acessado em: 13 jan. 2011.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; VERNEQUE, R.S. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 847-850, 2000.

BURDOVÁ, O.; BARANOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A.; RÓZANSKA, H.; ROLA, J.G. Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, n. 46, p. 325-329, 2002.

CAMPOS, D.C. **Queijo**: breve histórico e principais características. Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microbiologia Agrícola. Piracicaba: ESALQ; NAPMA, 2001. 59p. (NAPMA, n.11).

CARDOSO, C.C.; VEIGA, S.M.O.M.; NASCIMENTO, L.C.; FIORINI, J.E.; AMARAL, L.A. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização do ozônio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 59-61, 2003.

CARVALHO, J.D.G. **Avaliação da Qualidade de Queijos Tipo Minas Frescal Elaborados por Diferentes Processos Tecnológicos e Comercializados em Campinas-SP**. 2003. 107f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CARVALHO *et al.*, Comunicado Técnico: O Brasil no cenário mundial de lácteos. **EMBRAPA Gado de Leite**, Juiz de Fora – MG, out., 2006 A.

CARVALHO, F.; ASBAHR, D.; GODOY A. A. R.; COLODETTE, J. L. Branqueamento com Ozônio em pH Neutro – Um Novo Conceito. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 1, p. 71-88, 2006 B.

CAVALCANTE, D.A. **Avaliação do Tratamento com Água Ozonizada para Higienização de Alface (*Latuca sativa*)**. Campinas, 2007, 91p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

CERQUEIRA M.M.O.P; LEITE, M.O. Doenças Transmissíveis pelo Leite e Derivados. Caderno Escolar Técnico Veterinária, Belo Horizonte, v.13, n.16, p. 39-62, 1995.

CORRÊA, A.F. **Modelagem de um sistema de gestão da pecuária leiteira sob o preceito da Teoria das restrições**, Porto Alegre, 2003, 157 p. Dissertação (Mestrado em Agronegócios), Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

COSTA, F.M.A. et al. Variação do teor de gordura no leite bovino *in natura*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n.5, p.763-769, 1992.

DAHMER, A.M. **Gestão da Qualidade na indústria de leite do Estado de Mato Grosso do Sul**, Campo Grande, 2006, 220 p. Dissertação (Mestrado em Agronegócios), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

DOSTI, B.; GUZEL-SEYDIM, Z.; GREENE, A. K. Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 1, p. 19-24, 2005.

DURR, J.W.; MORO, D.V.; RHEINHEIMER, V.; TOMAZI, T. Estado atual da qualidade do leite no Rio Grande do Sul. In: MESQUITA, A.J.; DURR, J.W.; COELHO, K.O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento Gráfico e Editora, 2006. p. 83-94.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS (EPAMIG). **Os queijos na Fazenda**. Rio de Janeiro: Globo, 1987. 219p. (Coleção do Agricultor-Laticínios).

EMBRAPA, **EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA** – Gado de Leite. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/>. Acesso em: 25 jan. 2009.

ESCRICHE, I.; SERRA, J.A.; GÓMEZ, M.; GALOTTO, M.J. Effect of Ozone Treatment and Storage Temperature on Physicochemical Properties of Mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Food Science and Technology International**, v. 7, p. 251-258, 2001.

ESKIN, M. N. A. **Biochemistry of foods**. 2 ed. London: Academic Press,. 557p. 1990.

FAGAN *et al.* Avaliação e Implantação de Boas Práticas nos Principais Pontos de Contaminação Microbiológica na Produção Leiteira. **Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, p. 83-92, 2005.

FERNANDES, A.M. **Efeito dos níveis de células somáticas sobre a qualidade do leite integral obtido por processo UAT direto**, 2007, 109 p. Tese (Doutorado em Zootecnia), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP).

FONSECA, L.F.L; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle da Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.

GIBSON, H.; SINCLAIR, L.A.; BRIZUELA, C.M.; WORTON, H.L.; PROTHEROE, R.G. Effectiveness of Selected Premilking Teat-Cleaning Regimes in Reducing Teat Microbial Load on Commercial Dairy Farms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 295-300, 2008.

GOBBI, W.A O. **A pecuária leiteira na comunidade de Canoa – Ituiutaba (MG): persistência e resistência**, Uberlândia -MG, 2006, 126 p. Dissertação (Mestrado em Geografia), Instituto de Geografia, Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

GRAHAM, D. M. 1997. Use of ozone for food-processing. **Food Technology**. 51: 72-75.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.S.M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência Agrotécnica**, v. 29, n.1, p. 216-222, 2005.

GUZEL-SEYDIM, Z.B.; GREENE, A.K.; SEYDIM, A.C. Use of ozone in the food industry. **Lebensm.-Wiss u.-Technology**, v. 37, n. 4, p.453-460, 2004.

HILLERTON, J.E.; COOPER, J.; MORELLI, J. Preventing Bovine Mastitis by a Postmilking Teat Disinfectant Containing Acidified Sodium Chlorite. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 3, p 1201–1208, 2007.

HOFFMAN, F.L.; SILVA, J.V.; VINTURIM, T.M. Qualidade microbiológica de queijos tipo “Minas Frescal”, vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, v.16, n.96, p.69-76, mai. 2002.

HUNT, D. M; RIBEIRO, R., SHIKI, S.; BIASI, D.; FARIA, A.P. Comparação de indicadores de desempenho de produtores de leite localizados dentro e fora do assentamento de reforma agrária no triângulo mineiro. **Revista de Economia e Sociologia Rural**. Brasília, v.47, n.1, p-211-248, 2009.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 5. ed. New York: Chapman and Hall, 1996. 661p.

JAYARAO, B.M.; DONALDSON, S.C.; STRALEY, B.A.; SAWANT, A.A.; HEGDE, N.V.; BROWN, J.L. A Survey of Foodborne Pathogens in Bulk Tank Milk and Raw Milk Consumption Among Farm Families in Pennsylvania. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2451-2458, 2006.

KECHINSKI, C.P. **Avaliação do uso de ozônio e outros tratamentos alternativos para a conservação de mamão papaia (*Caraica papaya L.*)**, Porto Alegre-RS, 125 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Área de concentração: Fenômenos de Transporte e Operações Unitárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS), 2007.

KETTERINGHAM, L.; GAUSSERES, R.; JAMES, S.J.; JAMES, C. Application of aqueous ozone for treating pre-cut green peppers (*Capsicum annuum L.*) **Journal of Food Engeneering**, v. 76, n. 1, p. 104-111, 2006.

KHADRE, M.A., YOUSEF, A.E. Decontamination of a multilaminated aseptic food packaging material and stainless steel by ozone. **Journal of Food Safety**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2001A.

KHADRE, M.A., YOUSEF, A.E., KIM, J.G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**. Chicago, v.66, n.9, p.1242-1252, 2001B.

KIM, J.G. **Ozone as an antimicrobial agent in minimally processed foods** (DPhil thesis). Columbus, Ohio: Ohio State University. P.50-199. 1998.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E., CHISM, G.W. Use of ozone to inactivate microorganisms on Lettuce. **Journal of Food Safety**, v.19, p.17-37, 1999A.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E., DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62, n.9, p.1071-1087, 1999B.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 65, n. 3, p.521-528, 2000.

KOMOROWSKI, E.S. New Dairy Hygiene Legislation. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 2, p. 97-101, 2006.

KOSEKI, S.; ISOBE, S. Effect of Ozonated Water Treatment on Microbial Control and on Browning of Iceberg Lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 1, p. 154-160, 2006.

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R. *Ozone in water treatment: application and engineering*. Chelsea: AWWARF and Lewis Publishers, 1991. 568 p.

LAPOLLI, F. R.; SANTOS, L. F.; HÁSSEMER, M. E. N.; AISSE, M. M.; PIVELI, R. P. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In. GONÇALVES, R. F. (Coord.). *Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patógenos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica*. Vitória: PROSAB, 2003. p. 169-208.

LEGUBE, B.; LEITNER, N. K. V. Catalytic Ozonation: A Promising Advanced Oxidation Technology for Water Treatment. **Catalysis Today**, v. 53, n. 1, p. 61-72, 1999.

LIEBERGOTT, N.; van LIEROP, B.; SKOTHOS, A. A survey of the use of ozone in bleaching pulps - Part 1. **Tappi Journal**, v. 75, n. 1, p. 145-152, 1992.

LISITA, M. O. **Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo Minas Frescal em uma indústria de laticínios**. Piracicaba, SP. 2005. 61 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

MAGNUSSON, M.; CHRISTIANSSON, A.; SVESSON, B.; KOLSTRUP, C. Effect of Different Premilking Manual Teat-Cleaning Methods on Bacterial Spores in Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p.3866–3875 ,2006.

MICHAELLIS, **Moderno Dicionário da Língua Portuguesa**. Editora Melhoramentos Ltda., 2007.

MORAES, C.R. **Qualidade bacteriológica de leite bovino de mistura, *in natura* e beneficiado, e detecção sorológica de brucelose em rebanhos da região metropolitana de Porto Alegre-RS**, 2005, Porto Alegre-RS, 86p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Rural do Rio Grande do Sul (URRS).

MORELLI, A.M.F. ***Escherichia coli* O157: H7: Ocorrência em ambiente de produção de leite na microrregião de Viçosa, adesão em diferentes superfícies e resistência a sanitizantes**, Viçosa - MG, 2008, 192 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa (UFV).

MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil. 2002, Toledo-PR. **Anais do II Sul-Leite**. Maringá, ed. Geraldo Tadeu dos Santos *et al.* p. 206-217.

NADAS, A.; OLMO, M.; GARCÍA, J. M. Growth of *Botrytis cinerea* and Strawberry Quality in Ozone-enriched Atmospheres. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 5, p. 1798-1802, 2003.

NAITO, S.; TAKAHARA, H. Ozone Contribution in Food Industry in Japan. **Ozone: Science & Engineering**, v. 28, n. 6, p. 425-429, 2006.

NAJAFI, M.B.; KHODAPARAST, M.H.H. Efficacy of Ozone to Reduce Microbial Populations in Date Fruits. **Food Control**, Online Version, 2008.

NASCIMENTO, L. C.; LIMA, L. C. O.; PICOLLI, R. H.; FIORINI, J. E.; DUARTE, S. M. S.; SILVA, J. M. S. F.; OLIVEIRA, N. M. S.; VEIGA, S. M. O. M. Ozônio e Ultra-Som: Processos Alternativos para o Tratamento do Café Despolpado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 282-294, 2008.

NERO, L. A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp* em leite *in natura* produzido em quatro regiões leiteiras do Brasil: ocorrência e fatores que**

**interferem na sua detecção**, São Paulo – SP, 2005, 141p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos, Área: Bromatologia), Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), Universidade de São Paulo (USP).

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Leite *in natura* de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v.25, n.1, p.191-95, jan-mar, 2005.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F.E.V. Microbiological quality of Milk determined by production characteristics. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v.29, n. 2, p.386-390, abr-jun, 2009.

NOVAK, J.S.; YUAN, J.T.C. Increased Inactivation of Ozone-Treated *Clostridium perfringens* Vegetative Cells and Spores on Fabricated Beef Surfaces Using Mild Heat. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 2, p. 342-346, 2004.

OLIVEIRA, C. A. F.; MORENO, J. F. G.; MESTIERI, L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos minas frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do Estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v. 12, p.31-35, 1998.

OLIVEIRA, C.A.F.; FONSECA, L. GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar** [online], v. 13, n. 62, p.10-16, 1999.

OLIVEIRA, R.P.S. **Condições Microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba-SP**, Piracicaba–SP, 2005, 97p., Dissertação (Mestrado em Ciências, Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP).

PASTORIZA, L.; BERNÁRDEZ, M.; SAMPEDRO, G.; CABO, M.L.; HERRERA, J.J.R. Use of sterile and ozonized water as a strategy to stabilize the quality of stored refrigerated fresh fish. **Food Control**, Online Version, 2007.

PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo-de-minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51. n. 5, 1999.

PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Química Nova*, São Paulo, v.27, n.2, p.393-300, 2004.

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade Microbiológica de Leite *In natura* Refrigerado e Isolamento de Bactérias Psicrófilas Proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; JORGE, A.F.L. Variação sazonal e correlação entre propriedades de leite utilizados na avaliação da qualidade. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.64, p. 35-38, 1999.

REIS *et al.* Procedimentos de coleta de leite *in natura* individual e sua relação com a composição físico-química e a contagem de células somáticas. **Ciências Rurais**, Santa Maria – RS, v.37, n. 4, 2007.

RIBEIRO, M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: Andrade S.F. (Ed.), **Manual de Terapêutica Veterinária**. Roca: São Paulo, 2008. 3 ed, 936p.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo de Minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

RODRIGUEZ-ROMO, L.A.; YOUSEF, A.E. Inactivation of *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* on Shell Eggs by Ozone and UV Radiation. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 4, p. 711-717, 2005.

ROSA, M.S.; COSTA, M.J.R.P.; SANT`ANNA, A.C.; MADUREIRA, A.P. **Boas Práticas de Manejo – Ordenha**. Jaboticabal: FUNEP, 2009. 43 p.

ROSENFELD, A. M. F. **Retenção láctea: Fator predisponente às inflamações das glândulas mamárias de bovinos. Características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite**, São Paulo–SP, 2005, 129p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP).

RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B.; AVLIFFE, G. A. J. *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. 826 p.

SALVADOR, A; ABAD, I; ARNAL, L.; MARTINEZ-JÁVEGA, J.M. Effect of ozone on postharvest quality of persimmon. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 6, p. 443 – 446, 2006.

SANGALETTI, N; PORTO, E; BRAZACA, S.G.C.; DALLA DEA, R.C.M.; SILVA, M.V. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 262-269, 2009.

SANTANA, E.H.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; MORAES, L.B.; GUSMÃO, V.V.; PEREIRA, M.S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina-PR, v. 22, n.2, p. 145-154, jul./dez. 2001.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Importância de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2007. 314 p.

SANTOS, M. **A urbanização brasileira**. 5.ed. São Paulo: Edusp, 2005.

SEHESTED, K.; CORFITZEN, H.; HOLCMAN, J.; HART, E. J. Decomposition of Ozone in Aqueous Acetic Acid Solutions. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 96, n. 2, p. 1005-1009, 1992.

SELMA, M. V.; ALLENDE, A.; LÓPEZ-GALVEZ, F.; CONESA, M. A.; GIL, M. I. Disinfection Potential of Ozone, Ultraviolet-C and Their Combination in Wash Water for the Fresh-Cut Vegetable Industry. **Food Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 809-814, 2008A.

SELMA, M. V.; ALLENDE, A.; IBÁÑEZ, A.M.; CANTWELL, M; SUSLOW, T. Reduction by gaseous ozone of *Salmonella* and microbial flora associated with fresh-cut cantaloupe. **Food Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 558-565, 2008B.

SEO, S.; KING, J. M.; PRINYAWIWATKUL, W. Simultaneous Depolymerization and Decolorization of Chitosan by Ozone Treatment. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 522-526, 2007.

SHARMA, R.R.; DEMIRCI, A. Application of ozone for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfafa sprouts. **Journal of Food Processing Preservation**, v. 27, p.51-64, 2003.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of minas frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology** v. 81, p. 241-248, 2003.

SIQUEIRA, K.B.; ALMEIDA, M.F. Projeções para o mercado lácteo mundial. **Panorama do Leite online-** Centro de Inteligência do Leite- CILeite [online], v. 4, n. 43, jun. 2010. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/panorama/conjuntura42.html>. Acessado em: 15 jun. 2010.

TAVERNA, M. **Reflexões sobre a qualidade do leite**. In: O compromisso com a qualidade do leite no Brasil. Passo Fundo. Ed. Universitária – Universidade de Passo Fundo. 331 p. 2004.

VAZ-VELHO, M.; SILVA, M.; PESSOA, J.; GIBBS, P. Inactivation by ozone of *Listeria innocua* on salmon-trout during cold-smoke processing. **Food Control**, v. 17, n. 8, p. 609-616, 2006.

WALDNER, D.N. et al. **Managing milk composition: normal sources of variation**. Acesso em 12 set. 2005. Online. Disponível em: <http://www.osuextra.com>

WALSTRA *et al.* **Dairy Science and Technology**, 2<sup>a</sup> ed., Boca Raton, Florida: EUA, 2006, 781p.

WATANUKI, M.M. **Deteção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação de seus esporos a temperatura ambiente e sob refrigeração após processo de fervura**. Piracicaba-SP, 2008, 93 p., Dissertação (Mestrado em Ciência, Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP).

WEISS, D. et al. Variable milking intervals and milk composition. **Milchwissenschaft**, v.57, n.5, p. 246-249, 2002.

WRONSKI, M.; JARMUS, W.; SRKZYPED, R. Interactions among re-milking and post-milking procedures used in cows for protecting udder health. **Medycyna Weterynaryjna**, v.6, n.3, p.327-331, 2008.

WU, J.; LUAN, T.; LAN, C.; LO, T.W.H.; CHAN, G.Y.S. Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water. **Food Control**, v.18, n. 5, p. 466-472, 2007.

YANG, P.P.W., CHEN, T.C. Stability of ozone and its germicidal properties on poultry meat microorganisms in liquid phase. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.2, 1979.

ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; JUNIOR, W.S.; ZANELA, C.; MARQUES, L.T.; MARTINS, P.R.G. Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 1, p. 153-159, 2006.

ZOCCAL, R.; STOCK, L.A.; REIS FILHO, R.J.C.; CARNEIRO, A.V.; MARTINS, P.C.; CARVALHO, G.R. Agropolo Sobral. In: ZOCCAL, R.; MARTINS, P.C.; CARNEIRO, A.V.; FILHO, R.J.C.R.; NOGUEIRA, J.N.A. **Competitividade da cadeia produtiva do leite no Ceará: produção primária**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2008. p. 341-364. Disponível em:

<http://www.prodemb.cnptia.embrapa.br/busca.jsp?baseDados=INSTIT&fraseBusca=CNPGL%20em%20SIG&forcaDetalhe=0>. Acessado em: 13 jan. 2010.

## CAPÍTULO II. AÇÃO DA ÁGUA OZONIZADA NA DESINFECÇÃO DA PELE DOS TETOS DE VACAS HOLANDESAS ANTES DA ORDENHA E SUA INFLUÊNCIA NA QUALIDADE DO LEITE BOVINO

### Resumo

A qualidade do leite que chega às indústrias de processamento é determinada durante o processo de ordenha, condições de armazenamento e transporte. O interior da glândula mamária, o exterior do úbere e a pele dos tetos das vacas podem ser fontes de contaminação microbiana do leite *in natura*, tornando-se fundamental, entre outras ações, uma higienização eficiente dos tetos antes do processo, no intuito de preservar a qualidade microbiológica do produto. O ozônio é um agente antimicrobiano com alta reatividade e decomposição espontânea em produtos não tóxicos. É indicado para a descontaminação de produtos alimentícios, equipamentos, ambientes e superfícies que entram em contato com alimentos. O objetivo deste trabalho foi estudar a eficiência da ação de água ozonizada, em comparação à Clorexidina, na desinfecção da pele dos tetos antes da ordenha e sua influência na qualidade do leite bovino. Para as contagens iniciais dos microrganismos alvos realizaram-se, na chegada dos animais nas estações de ordenha, esfregaços nos quatro tetos de cada animal, com *swab* de hastes flexíveis com pontas de algodão, perfazendo um total de 48 tetos analisados. Imediatamente após a sanitização e secagem dos tetos (*pré-dipping*), realizaram-se novamente esfregaços nos tetos, com a finalidade de avaliar as populações microbianas remanescentes. Após a desinfecção dos tetos, os animais foram ordenhados individualmente, por ordenhadeira mecânica, tipo espinha de peixe, duplo 6, composto por terminal de sucção e recipiente coletor, do qual foram colhidas amostras de leite, por animal, para análises microbiológica e físico química. A eficiência da utilização da água ozonizada, na concentração de 2,0mg.L<sup>-1</sup>, por 30s, como agente sanitizante no processo de higienização dos tetos, apresentou número de reduções decimais (NRD) de 2,52, 1,99 e 1,50 para aeróbios mesófilos, *Staphylococcus* sp e enterobactérias, respectivamente. O uso da clorexidina a 2%, por 30s, resultou em NRD de 2,36, 2,03 e 1,16 para os microrganismos aeróbios mesófilos, *Staphylococcus* sp e enterobactérias, respectivamente. As contagens de psicrotóxicos, *Staphylococcus* sp, enterobactérias e aeróbios mesófilos realizadas no leite *in natura*, foram de 3,2x10<sup>3</sup>, 2,0x10<sup>1</sup>, 4,7x10<sup>1</sup> e 1,8x10<sup>3</sup>UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente para os tetos tratados com clorexidina a 2% e de 2,0x10<sup>3</sup>, 5,6x10<sup>0</sup>, 0,0 e 1,9x10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, para os tetos tratados com água ozonizada a 2,0mg.L<sup>-1</sup>. Não foram constatadas alterações nos parâmetros físico-químicos do leite *in natura* proveniente dos animais tratados com clorexidina 2% e água ozonizada na concentração de 2,0mg.L<sup>-1</sup> ao nível de significância de 5% (p<0,05), o que é considerado positivo para a indústria de laticínios.

**Palavras-chave:** desinfecção de tetos, leite, ozônio.

## CHAPTER II: OZONATED WATER ACTION IN DISINFECTING THE TEAT SKIN OF HOLSTEIN COWS BEFORE MILKING AND ITS INFLUENCE ON THE MILK QUALITY

### Abstract

The quality of the milk processed in industries is determined during the milking process, storage and transport conditions. The interior of the mammary gland, the udder exterior and the teat skin can be sources of raw milk microbial contamination, making it essential, among other actions, an efficient cleaning of the teats before the milking process in order to preserve the product microbial quality. Ozone is a strong antimicrobial agent with high reactivity and spontaneous decomposition to non-toxic products. It is indicated for the decontamination of food products, equipment, environments and surfaces that come into contact with food. The aim of this work was to study the efficiency of ozonated water action compared to chlorhexidine in disinfecting the teats skin before milking and its influence on the quality of bovine milk. For the initial counts of the target microorganisms, smears with cotton tips swabs were held in the four teats of each animal during their arrival in the milking stations, making a total of 48 caps analyzed. Immediately after the teats sanitizing and drying (pre-dipping), smears took place again on the teats, aiming at assessing the remaining microbial populations. After the teats disinfection, the animals were milked individually, herringbone type, double six, composed of end suction and collecting vessel, from which milk samples were collected for microbiological, physicochemical analysis. The efficiency of the ozonated water use at a concentration of  $2.0\text{mgL}^{-1}$  and sanitizing agent in the process of cleaning teats, presented decimal number reductions (NRD) of 2.52, 1.99 and 1.50 for aerobic mesophilic, *Staphylococcus sp* and enterobactérias, respectively. But the use of 2% chlorhexidine resulted in NRD of 2.36, 2.03 and 1.16 for aerobic mesophilic microorganisms, *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus sp*, respectively. There were no adverse effects due to the use of these sanitizers, such as irritation or swelling near the surface of the teats skin, as well as changes in the behavior of the treated animals. The psychotropic counts, *Staphylococcus sp*, *Enterobacteriaceae* and aerobic mesophilic carried in the raw milk were  $3.2 \times 10^3$ ,  $2.0 \times 10^1$ ,  $4.7 \times 10^1$  and  $1.8 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>, respectively, for the teats treated with 2% chlorhexidine,  $2.0 \times 10^3$ ,  $5.6 \times 10^0$ , 0.00 and  $1.90 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> for the teats treated with ozonated water with  $2.0 \text{mgL}^{-1}$ . There were no changes in the physicochemical composition of the raw milk from animals treated with 2% chlorhexidine and ozonated water at a concentration of  $2.0 \text{mgL}^{-1}$  at a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ), which is considered positive for the dairy industry.

**Keywords:** disinfection of teats, milk and ozone.

## 2.1 Introdução

A contaminação bacteriana do leite cru pode ocorrer a partir do próprio animal, do homem e do ambiente. A obtenção do leite de vacas saudáveis, em condições higiênicas adequadas, e o seu resfriamento imediato a 4°C, são medidas fundamentais e primárias para garantir a qualidade e a segurança do leite e seus derivados (ARCURI et al., 2006, p. 441). É essencial que as boas práticas de higiene, dentro dos ambientes de manipulação de produtos alimentícios se tornem hábitos.

A falta de higiene é resultado de desconhecimento e falta de cuidado, e pode resultar em consequências graves, podendo causar toxinfecções alimentares, em razão, principalmente, da presença de microrganismos patogênicos tais como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella sp.*

Uma ampla variedade de gêneros e espécies de microrganismos no ambiente da vaca pode estar presente na superfície das tetas e serão transmitidos para o leite e para os equipamentos de ordenha. Alguns podem se estabelecer se as condições forem favoráveis; outros podem ser somente contaminantes transientes. O leite cru, fresco pode inibir ou até mesmo inativar alguns dos microrganismos existente na superfície das tetas, então, mesmo presentes em números altos, podem não ser detectados (CHAMBERS, 2002).

As tetas frequentemente se tornam sujas com esterco, lama e materiais da cama, como, palha, serragem, lascas de madeira ou areia. Se não for removida antes da ordenha, esta sujeira, junto com o grande número de microrganismos associados a ela, será introduzida no leite. O número e tipo de microrganismos variam de acordo com o tipo e quantidade de sujeira presente nas tetas. (COUSIN, 1982).

O leite de vacas com tetas muito sujas com esterco pode ter uma contagem padrão em placas entre  $10^5$  UFC.teta<sup>-1</sup> a  $10^7$  UFC.teta<sup>-1</sup>. Micrococos, incluindo estafilococos coagulase-negativa, estão entre os grupos predominantes presentes ( $\sim 10^4$  UFC.teta<sup>-1</sup>). Estreptococos, principalmente tipos fecais, também são numerosos, mas os bastonetes Gram-negativos, incluindo coliformes, são bem menos numerosos. A contagem de coliformes raramente excede  $10^2$  UFC.teta<sup>-1</sup>. Parece que esses organismos, ao contrário dos micrococos, por exemplo, não sobrevivem bem sobre a pele das tetas, embora eles possam constituir uma grande proporção da microbiota dos materiais da cama (CHAMBERS, 2002)

Uma série de medidas deve ser seguida durante o processo de ordenha mecânica com a finalidade de diminuir o número de microrganismos que podem ser transferidos ao leite, depreciando sua qualidade microbiológica. (AMARAL *et al.*, 2004). Gibson *et al.* (2008) afirmam que, apesar dos estudos realizados sobre a higienização de tetos de vacas, não há um único método recomendado e a eficácia de práticas usuais em relação à redução da contagem microbiana nos tetos ainda é incerta.

Os produtos mais utilizados na higienização de tetos são: lavagem com água; imersão em solução de iodo; imersão em solução de clorexidina; imersão em solução de hipoclorito de sódio e uso de toalhas de papel desinfetantes (AMARAL *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2000; FONSECA e SANTOS, 2000).

Estudos provenientes da indústria de alimentos mostram que o uso de certos desinfetantes em altas concentrações está contribuindo para o surgimento de microrganismos resistentes a desinfecção. Bactérias expostas a altas concentrações de desinfetantes se tornam mais resistentes, promovendo a resistência cruzada dos microrganismos aos desinfetantes e antimicrobianos KHADRE *et al.*(2001B).

A necessidade de um antimicrobiano potente, assim como tratamentos alternativos para redução da contaminação de alimentos, aumentou nos últimos anos. A indústria está pesquisando desinfetantes que sejam efetivos contra patógenos e seguros para o uso em suas 'plantas'. Um dos candidatos é o ozônio que está sendo utilizado como sanitizante no tratamento de águas na Europa desde o início do século XX (KIM *et al.*, 1999B).

O ozônio é um forte agente microbiano com alta reatividade e decomposição espontânea em produtos não tóxicos. Pode ser aplicado em alimentos nas formas líquida e gasosa. O ozônio molecular ou seus produtos de decomposição inativam microrganismos rapidamente reagindo com elementos vitais da célula, como enzimas intracelulares, ácidos nucléicos e membranas celulares. O seu uso combinado a outros processos para diminuição da carga microbiana resulta em um sinergismo, sendo utilizado em muitos casos. O ozônio é adequado para descontaminar produtos alimentícios, equipamentos, ambientes, superfícies que entram em contato com alimentos, tratamento de água e efluentes, etc. (KIM *et al.*, 1999A; KHADRE *et al.*, 2001B).

O presente estudo teve por objetivo estudar os efeitos da água ozonizada e da clorexidina na sanitização da pele de tetos de vacas leiteiras da raça holandesa, bem como verificar sua influência sobre a qualidade do leite *in natura*.

## **2.2 Material e Métodos**

### **2.2.1 Definição dos grupos experimentais e repetições**

Foram selecionadas 24 vacas leiteiras da raça holandesa, do rebanho da Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga (FAYS), mantidas em sistema de confinamento e ordenhadas mecanicamente três vezes ao dia, não medicadas com antibióticos nos sete dias que antecederam a realização deste experimento, realizado em duplicata, nos meses de outubro e novembro de 2008.

Metade dos animais foi submetida ao tratamento de sanitização da pele dos tetos antes das ordenhas (*pré-dipping*) com água ozonizada, enquanto que outras doze vacas compuseram o grupo controle e continuaram a ter seus tetos sanitizados com solução de clorexidina, como procedimento de rotina utilizado na propriedade.

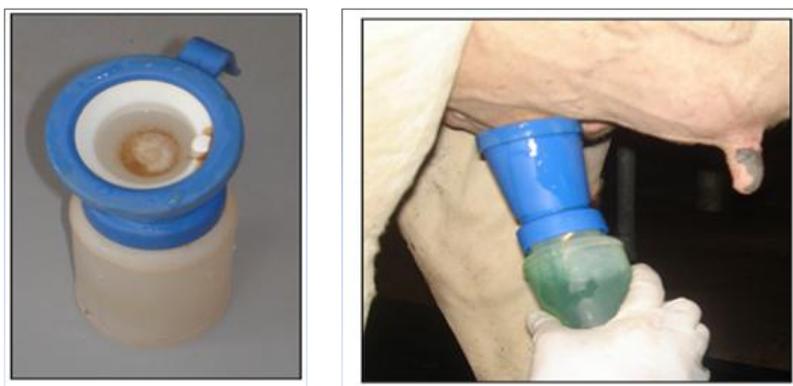
A partir dos materiais coletados, *swabs* de pele e leite *in natura*, foram realizadas análises microbiológicas e, microbiológicas/físico-químicas respectivamente, em triplicata.

### **2.2.2 Higienização dos Tetos**

As vacas selecionadas para o experimento foram amostradas individualmente e ordenhadas mecanicamente em seguida, durante a primeira ordenha do dia (05:00h).

O procedimento inicial consistiu em separar as 24 vacas pré-selecionadas na entrada da sala de ordenha. A seguir os animais foram acomodados doze a doze nas respectivas unidades de ordenha da sala modelo espinha de peixe, duplo seis, para início do protocolo tradicional de higiene pré-ordenha baseado na remoção mecânica da sujeira aderida à pele dos tetos com auxílio da mão das ordenhadoras, seguida do teste da caneca de fundo preto para detecção de casos de mastite clínica, descarte dos três primeiros jatos de leite de cada teto e posterior sanitização.

A sanitização foi realizada com o auxílio de um frasco do tipo “*onway*” (sem retorno), como apresentado na figura 2.1, propiciando adequada imersão e envolvimento da pele dos tetos dos animais com o sanitizante em uso, aplicado em movimentos ascendentes e descendentes do frasco, durante um período de contato de 30 segundos.



**Figura 2.1** – Processo de Sanitização dos Tetos com a utilização de frasco lavador tipo *one way*.

## 2.2.3 Sanitizantes

### 2.2.3.1 Água Ozonizada

A água de abastecimento da propriedade foi ozonizada à concentração de  $2,0\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em uma cuba de aço inoxidável com capacidade de 50 litros, por borbulhamento, através de um sistema de recirculação. O gerador de ozônio utilizado foi o modelo PNZ 714<sup>®</sup>, da empresa Panozon, dotado de concentrador de oxigênio a 90-95% de pureza, tanque de contato, sistema de injeção com bomba para filtração e sensor de potencial de óxido redução para garantir a transferência eficiente do ozônio gerado para a água, além de um tanque de gaseificação com a função de separar o ozônio produzido na forma de gás, retirando-o e enviando-o, através de tubulação, para um circuito externo de conversão do mesmo em oxigênio.

A fim de se comprovar que a concentração do ozônio se manteria estável à concentração de  $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante a realização de todas as etapas e procedimentos do experimento foi utilizado um método colorimétrico, que consiste na diluição de um sachê contendo reagente em pó N-Dietil-P-Fenilendiamina na água ozonizada. Esta diluição desenvolve uma cor rosada de intensidade variável que indica o teor de ozônio contido na água.

### **2.2.3.2 Clorexidina – Cetrimida**

Foi utilizado o sanitizante comercial Clorexidina-Cetrimida, da empresa Chemitec<sup>®</sup>, à base de digluconato de clorexidina a 20% e cloreto de cetrimônio (cetrimida), antisséptico pronto para uso com clorexidina à concentração de 2%.

### **2.2.4 Swab-Test dos Tetos das Vacas**

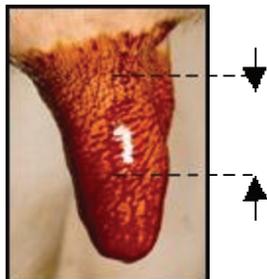
Na técnica de *swab-test* foram utilizadas hastes flexíveis com pontas de algodão esterilizadas e descartáveis da marca comercial Sterile<sup>®</sup>. Para determinar as populações iniciais dos microrganismos em estudo foram realizados, na chegada dos animais em suas unidades individuais de ordenha, esfregaços nos quatro tetos de cada animal, perfazendo 48 tetos analisados. Novo esfregaço foi realizado nos 48 tetos imediatamente após o procedimento de sanitização e secagem dos mesmos para enumeração das populações microbianas remanescentes.

Os animais selecionados para avaliação foram tratados anteriormente ao experimento, pelo prazo de uma semana, utilizando-se água ozonizada no *pré-dipping* das três ordenhas do dia.

Ao final de uma semana foram realizadas as coletas dos *swabs* dos tetos para avaliação da eficácia dos sanitizantes. Tal procedimento foi adotado com o intuito de eliminar a ação da solução de clorexidina utilizada no protocolo de rotina da fazenda e também para observar possíveis efeitos do ozônio sobre a pele. Os mesmos procedimentos de sanitização e coleta foram utilizados para o grupo clorexidina 2%, possibilitando dessa forma, a comparação da ação dos dois sanitizantes.

Para efeito de cálculos de superfície os tetos das vacas foram considerados como sendo um cilindro apresentando em média, obtida de doze vacas, 4,0 cm de diâmetro. A altura da área amostrada foi de 2,5 cm, medida nos

tetos no momento da coleta, conforme ilustra a figura 2.2, a fim de totalizar uma área amostrada, aproximada, de 10 cm<sup>2</sup>.



**Figura 2.2** – Área média dos tetos amostrados.

Após a coleta dos *swabs* da pele dos tetos tratados, os mesmos foram colocados em tubos de ensaio contendo 9mL de solução tampão e agitados vigorosamente a fim de remover totalmente os resíduos aderidos durante a coleta para análise microbiológica em triplicata.

Foram colhidas amostra de leite de cada teto, de cada animal, imediatamente após o procedimento de sanitização e *swab-test*, e mantidas armazenadas sob refrigeração a 4°C, até o momento da realização das análises físico-químicas e microbiológicas, em triplicata.

### **2.2.5 Análises laboratoriais**

Todas as análises laboratoriais foram realizadas em triplicata no Laboratório do Laticínio da Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga (FAYS), imediatamente após as coletas.

#### **2.2.5.1 Análises Físico-Químicas**

As análises físico-químicas de composição (gordura e proteína) foram feitas utilizando-se o método infravermelho com o analisador Ekomilk M, modelo Milkama Kam 98-2A, aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A calibração e metodologia de análise seguida foi a descrita nas

instruções do equipamento. Foi realizada ainda análise de pH, de acordo com técnica descrita por Brasil (2006).

### **2.2.5.2 Análises Microbiológicas**

A partir da suspensão contida nos tubos de ensaio com os *swabs* em solução tampão foram preparadas diluições decimais seriadas com água peptonada 0,1% para contagem de *Staphylococcus sp.*, aeróbios mesófilos, enterobactérias. Das amostras de leite *in natura*, foram tomadas alíquotas de 25 mL e diluídas em 225 mL de solução salina peptonada 0,1% e preparadas as diluições decimais seriadas com água salina peptonada para determinação das contagens total, psicrotróficos, mesófilos, enterobactérias e *Staphylococcus sp.*.

Para a contagem de microrganismos mesófilos, contagem total e psicrotróficos foram utilizados o Ágar Plate Count - DIFCO® (PCA); para enterobactérias, o Ágar Violet Red Bile Dextrose - DIFCO® (VRBA), para *Staphylococcus sp.* o Ágar Baird Parker - DIFCO® (BP).

As contagens dos microrganismos pesquisados foram determinadas em triplicata transferindo-se 1 mL de cada diluição preparada a partir das amostras de *swab* e/ou leite *in natura*, para placas de Petri nas quais foram adicionados os meios de cultura específicos, previamente fundidos e resfriados a 45-46°C. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas para contagem total, aeróbios mesófilos, enterobactérias, *Staphylococcus sp.* e, a 7°C por 10 dias para psicrotróficos. Após os períodos de incubação foram contadas as placas com 25 a 250 colônias e aplicados os respectivos fatores de correção para cada diluição (APHA, 1992). Os resultados foram expressos em UFC.10cm<sup>-2</sup> para os *swabs* e por UFC.mL<sup>-1</sup> para as amostras de leite.

## 2.3 Análises Estatísticas

### 2.3.1 Sanitização dos tetos

Na avaliação da sanitização dos tetos foi considerado delineamento inteiramente casualizado com 2 tratamentos (higienização com clorexidina® 2% ou ozônio na concentração de 2,0mg.L<sup>-1</sup>) e 96 repetições para cada tratamento, totalizando 198 unidades experimentais, onde cada teto foi considerado como unidade experimental. Foram realizadas as contagens de mesófilos aeróbios, enterobactérias e *Staphylococcus sp.*,

No caso do leite *in natura* foi considerado delineamento inteiramente casualizado com 2 tratamentos (higienização com clorexidina® ou ozônio X concentração 2,0mgL<sup>-1</sup>) e 24 repetições para cada tratamento, totalizando 48 unidades experimentais, onde cada unidade experimental foi constituída por 25 mL de leite. Foram realizadas as contagens de psicotróficos, coliformes totais, enterobactérias e *Staphylococcus sp.*

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias e os dados que não respeitaram as premissas estatísticas foram submetidos à transformação logarítmica [Log(x+1)]. Para a análise do efeito dos tratamentos foi utilizado o Teste T-student através do procedimento TTEST do software estatístico SAS (SAS, 2004).

O modelo matemático utilizado foi:

$$y_{ij} = m + t_i + e_{ij} \text{ com } i = 1 \text{ ou } 2 \text{ e } j = 1, 2, \dots, 96$$

onde:

$y_{ij}$  é o valor observado da j-ésima parcela (repetição) que recebeu o tratamento i;

m é uma constante (média geral) comum a todas as observações;

$t_i$  é o efeito do i-ésimo tratamento (ou nível do fator) aplicado na parcela;

$e_{ij}$  é o efeito dos fatores não controlados na parcela.

Frente à grande variação dos desvios-padrões e em função da magnitude das medidas, calculados nos dois tratamentos para cada microrganismo estudado, efetuaram-se os cálculos através do logarítmico de cada determinação, calculando-se a seguir o número de reduções decimais (Logredução), bem como os novos valores de desvios-padrões a partir da média determinada. Desta forma, a utilização do logaritmo das contagens teve como objetivo corrigir a normalidade dos resíduos e manter a homogeneidade das variâncias.

As reduções decimais (NRD) foram calculadas por meio da seguinte fórmula:

$$\text{NRD (Logredução)} = \log_{10}(\text{contagem inicial}) - \log_{10}(\text{contagem após tratamento})$$

## 2.4 Resultados e Discussão

Os resultados dos tratamentos realizados com clorexidina e água ozonizada na pele dos tetos das vacas leiteiras antes do processo de ordenha são demonstrados, por meio da média dos logaritmos das contagens de microrganismos mesófilos, enterobactérias e *Staphylococcus sp.*, nas tabelas , 2.1, 2.2 e 2.3, respectivamente.

Assim, os resultados foram avaliados a partir do logaritmo das contagens antes da higienização (AH), após a sanitização (DH), e da redução obtida com a higienização (redução decimal).

**Tabela 2.1** – Ação da clorexidina 2% e da água ozonizada na concentração de 2,0mg.L<sup>-1</sup>, utilizados como pré-dipping, em 96 tetos, durante 30s, na redução da contagem de mesófilos aeróbios na pele de tetos de vacas leiteiras da raça holandesa

Variável	Clorexidina	Ozônio	P
	média ± desvio padrão	média ± desvio padrão	
LogAH	5,44 <sup>a</sup> ± 0,62	5,17 <sup>b</sup> ± 0,72	0,0064
LogDH	3,08 <sup>a</sup> ± 0,73	2,68 <sup>b</sup> ± 0,39	<0,0001
NRD	2,36 <sup>a</sup> ± 0,63	2,52 <sup>a</sup> ± 0,73	0,0892

Médias que tiveram P<0,05 foram consideradas estatisticamente diferentes pelo Teste T-student, onde AH - antes da higienização; DH - depois da higienização e NRD - Número de Reduções Decimais.

As contagem iniciais (AH) da pele dos tetos das vacas no momento em que elas chegaram para a ordenha apresentaram contagem de microrganismos aeróbios mesófilos de  $6,69 \times 10^5$  e  $4,23 \times 10^5$  UFC/10cm<sup>2</sup>, antes dos tratamentos com clorexidina e ozônio, respectivamente. Observa-se que estas contagens apresentam diferenças significativas. Tendo em vista que o ambiente em que os animais se encontram está diretamente relacionado com contaminação dos tetos por aeróbios mesófilos, podemos concluir que as diferenças entre as médias dos tetos de todas as vacas, que se apresentaram para o tratamento, são esperadas.

Observa-se, ainda, que as contagens iniciais demonstradas na tabela 2.1 confirmam o encontrado por Fagan *et al.* (2005) que foi de  $1,09 \times 10^5$  UFC.cm<sup>-2</sup>, porém diferentes das verificadas por Amaral *et al.* (2004) que foi de  $5,34 \times 10^{11}$  UFC.cm<sup>-2</sup>.

Após o tratamento com água ozonizada na concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup> e clorexidina a 2%, verificou-se na tabela 2.1 que as contagens de Aeróbios mesofilos foram reduzidas a  $6,12 \times 10^2$  e  $5,6 \times 10^3$  UFC/10cm<sup>2</sup>, respectivamente. Assim como para as contagens iniciais (AH), observa-se que os valores de

microrganismos após a higienização (DH) também foram diferentes estaticamente para o teste realizado.

Entretanto, o número de reduções decimais de microrganismos aeróbios mesófilos, para clorexidina e água ozonizada, foi de 2,36 e 2,52 ciclos logarítmicos, respectivamente, não apresentando diferença estatística entre eles, o que indica que ambos os sanitizantes foram eficazes na redução da população estudada.

Brito *et al.* (2000) obtiveram resultados similares ao deste estudo, uma vez que observaram uma redução média significativa de 2,20 ciclos logarítmicos na contagem total de bactérias na superfície dos tetos de vacas submetidas à *pré-dipping* com imersão em solução à base de iodo (4.000 ppm) seguida de secagem. Já para desinfecção efetuada com toalhas de papel desinfetante contendo etanol, cetrimida, digluconato de clorexidina e água, a redução média significativa foi de 2,4 ciclos logarítmicos e semelhante à encontrada para clorexidina e água oxonizada, conforme na tabela 2.

Fagan *et al.* (2005) verificaram que o *pré-dipping* realizado através de imersão direta dos tetos em solução de hipoclorito de sódio (750 ppm) reduziu a contagem de aeróbios mesófilos de  $6,1 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> para  $3,1 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>, e a de psicrotróficos de  $3,6 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> para  $6,7 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>. Quando os tetos foram lavados com água anteriormente à imersão em hipoclorito de sódio (750 ppm) as reduções observadas foram de  $2,1 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> para  $3,9 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> e de  $2,9 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> para  $5,1 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup> para aeróbios mesófilos e psicrotróficos, respectivamente. Quanto à lavagem dos tetos somente com água, observaram-se reduções para aeróbios mesófilos de  $5,5 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> para  $3,8 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> e para psicrotróficos de  $5,5 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> para  $2,1 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>.

As reduções logarítmicas encontradas por Fagan *et al.* (2005), quando utilizado o efeito combinado de lavagem com água e imersão dos tetos no hipoclorito de sódio são semelhantes ao verificado na tabela 2.1.

Conforme apresentado na tabela 2.2 verificou-se que, para as enterobactérias, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas para as contagens iniciais e após a higienização.

**Tabela 2.2** – Ação da clorexidina 2% e da água ozonizada na concentração de 2,0mg.L<sup>-1</sup>, utilizados como pré-dipping, em 96 tetos, durante 30s, na redução da contagem de enterobactérias na pele de tetos de vacas leiteiras da raça holandesa.

Variável	Clorexidina	Ozônio	P
	média ± desvio padrão	média ± desvio padrão	
LogAH	2,34 <sup>a</sup> ± 0,89	2,52 <sup>a</sup> ± 1,26	0,2538
LogDH	1,24 <sup>a</sup> ± 0,58	1,10 <sup>a</sup> ± 0,66	0,1216
NRD	1,16 <sup>a</sup> ± 0,58	1,50 <sup>b</sup> ± 0,91	0,002

Médias que tiveram P<0,05 foram consideradas estatisticamente diferentes pelo Teste T-student, onde AH - antes da higienização; DH - depois da higienização e NRD - Número de Reduções Decimais.

No momento em que as vacas chegaram na estação de ordenha apresentaram contagens médias de 1,0X10<sup>3</sup> e 3,4X10<sup>3</sup> UFC/10cm<sup>2</sup> de enterobactérias para os lotes que seriam tratados com clorexidina e água ozonizada, respectivamente. Após os referidos tratamentos os resultados foram de 5,0X10 e 6,4X10 UFC/10cm<sup>2</sup>, respectivamente.

Desta forma os tratamentos com clorexidina e água ozonizada apresentaram reduções decimais de 1,16 e 1,50 ciclos logarítmicos, respectivamente. Estes reduções foram significativamente diferentes para p<0,05, sendo que a água ozonizada apresentou maior eficiência que a clorexidina.

A tabela 2.3 demonstra os dados para *Staphylococcus sp.*, que é um microrganismo de elevada importância por ser um dos responsáveis pela ocorrência de mastite clínica e subclínica em rebanhos leiteiros.

**Tabela 2.3** – Ação da clorexidina 2% e da água ozonizada na concentração de 2,0mg.L<sup>-1</sup>, utilizados como pré-dipping, em 96 tetos, durante 30s, na redução da contagem de *Staphylococcus sp* na pele de tetos de vacas leiteiras da raça holandesa.

Variável	Clorexidina média ± desvio padrão	Ozônio média ± desvio padrão	P
LogAH	4,09 <sup>a</sup> ± 0,80	3,92 <sup>a</sup> ± 0,88	0,1731
LogDH	2,07 <sup>a</sup> ± 0,50	1,44 <sup>b</sup> ± 0,70	<,0001
NRD	2,03 <sup>a</sup> ± 0,63	1,99 <sup>a</sup> ± 0,82	0,7474

Médias que tiveram P<0,05 foram consideradas estatisticamente diferentes pelo Teste T-student, onde AH - antes da higienização; DH - depois da higienização e NRD - Número de Reduções Decimais.

Foi observado que o rebanho em estudo neste trabalho apresentou uma média de *Staphylococcus sp*, antes da sanitização com clorexidina ou água ozonizada, de 5,3X10<sup>4</sup> e 6,2X10<sup>4</sup> UFC/10cm<sup>2</sup>, não apresentando diferenças estatísticas para os tratamentos.

Santos (2006) analisou o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de *Staphylococcus sp*. e enterobactérias isoladas de mastite recorrente e averiguou que o *Staphylococcus aureus* tem sido o mais frequentemente isolado tanto de infecções clínicas como subclínicas em vacas leiteiras, porém o *Staphylococcus sp*. se destaca pela capacidade de ser ou se tornar resistente a um grande número de antibióticos. Espécies desse gênero, isolados em ambiente hospitalar humano, têm mostrado perfil de multiresistência, sendo que o uso frequente e indiscriminado de antimicrobianos está associado ao agravamento dessa resistência.

As análises realizadas após o tratamento com clorexidina e água ozonizada apresentaram contagem de *Staphylococcus spp.* de 2,23X10<sup>2</sup> e 7,9X10 UFC/10cm<sup>2</sup>, respectivamente. Estas contagens representam reduções decimais, em relação às contagens anteriores a sanitização de 2,03 e 1,99 ciclos logaritmos, respectivamente.

A figura 2.3 apresenta o frasco utilizado para imersão dos tetos com os sanitizantes. O sanitizante representado é a água ozonizada a concentração de  $2,0\text{mg.L}^{-1}$ .



**Figura 2.3** – Frasco Lavador revelando depósito de areia junto ao fundo

Observou-se como fator favorável na utilização da solução de água ozonizada na concentração de  $2,0\text{mg.L}^{-1}$  em relação a clorexidina 2%, a sua tensão superficial, que permitiu uma maior molhabilidade dos tetos, lavando e sanitizando-os de forma mais efetiva. Fato este comprovado pelo resíduo de sujeira dos tetos depositado no fundo do frasco lavador após cada uma das aplicações, conforme ilustrado na figura 2.3.

As retiradas destas sujidades representam, teoricamente, um produto final de melhor qualidade, além de evitar danos ao equipamento de ordenha, o que representa, desta forma, maior economia financeira para os produtores.

É interessante salientar, ainda, que as vacas e novilhas ficaram sob observação e acompanhamento visual durante todo o período do experimento e, por sete dias, após o tratamento com os sanitizantes em questão, não tendo sido constatados nenhum efeito adverso, como irritação ou edema, junto à superfície dos tetos dos animais amostrados, bem como alterações de comportamento dos mesmos.

A tabela 2.4 apresenta o logarítmico das contagens de microrganismos psicotróficos, *Staphylococcus sp*, enterobactéreas e contagem total no leite *in*

*natura*, após a sanitização dos tetos com clorexidina 2% e água ozonizada na concentração de 2,0mg.L<sup>-1</sup>.

As contagens de psicotróficos, *Staphylococcus sp*, enterobactérias e contagem total realizadas no leite *in natura*, foram de 3,21x10<sup>3</sup>, 2,01x10<sup>1</sup>, 4,75x10<sup>1</sup> e 1,82x10<sup>3</sup>UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente para os tetos tratados com clorexidina a 2% e de 2,07x10<sup>3</sup>, 5,69x10<sup>0</sup>, <1 e 1,90x10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, para os tetos tratados com água ozonizada a 2,0mgL<sup>-1</sup>.

**Tabela 2.4** – Média do logaritmo da contagem bacteriana do leite *in natura* após a sanitização dos tetos com clorexidina 2% e água ozonizada na concentração de 2,0mg.L<sup>-1</sup>.

Variável	Corexidina	Ozônio	P
	média ± desvio padrão	média ± desvio padrão	
Psicotróficos	3,37 <sup>a</sup> ± 0,36	3,12 <sup>b</sup> ± 0,40	0,0273
<i>Sthafilococcus spp</i>	0,32 <sup>a</sup> ± 0,75	0,21 <sup>a</sup> ± 0,56	0,5360
Enterobactérias	0,48 <sup>a</sup> ± 0,96	0,01 <sup>b</sup> ± 0,00	0,0226
Contagem Total	3,06 <sup>a</sup> ± 0,36	3,07 <sup>a</sup> ± 0,39	0,9446

Médias que tiveram P<0,05 foram consideradas estatisticamente diferentes pelo Teste T-student.

Os valores médios verificados na tabela 2.4, em alguns casos, apresentaram valores menores que seus respectivos desvios-padrões, situação essa decorrente das características individual de cada animal amostrado, podendo a vaca apresentar um quadro de contaminação maior ou menor comparado com o restante do rebanho.

É válido lembrar, que cada teto representou uma unidade de leite individual em cada animal, não havendo interligação entre os quartos mamários, e que os dois tratamentos dispensados tiveram ação apenas sobre a superfície externa dos tetos, não havendo, ação sobre parte interna dos tetos dos animais.

Constata-se, de acordo com a tabela 2.4, que a qualidade do leite, no que diz respeito às bactérias psicotróficas e enterobactérias apresentou diferenças significativas (P<0,05), resultando em uma melhor condição para a água

ozonizada em relação à clorexidina. Para *Staphylococcus sp* e contagem total não houve diferença significativa entre os dois tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Na União Européia, a legislação sobre higiene aplicável a produtos lácteos foi alterada em 01 de janeiro de 2006 com a revogação da Diretriz de Higiene em Laticínios 92/46/EEC. Nessa diretriz, foi estabelecido que deve haver uma contagem total máxima de  $3,0 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> para leite *in natura* destinado à ingestão e que não tenha passado por nenhum tratamento nas 36 horas de aceitação (KOMOROWSKI, 2006). Desta forma, conclui-se que o leite do estudo em questão permanece de acordo com a legislação européia.

Todavia, no Brasil, evidências de que o leite produzido e consumido não apresenta, em sua totalidade, a qualidade desejada, resultaram no desenvolvimento de novas políticas de incentivo à produção leiteira, envolvendo os setores científicos e econômicos da área, em busca de alternativas para alterar esse panorama. Como fruto das novas políticas de desenvolvimento, foi publicada a Instrução Normativa (IN) 51 (BRASIL, 2002), que abrange os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite *In natura* Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite *In natura* Refrigerado e seu Transporte a Granel, que define, dentre outros requisitos, que a contagem total de microrganismos para a região sudeste de 01 julho de 2007 até 01 de julho de 2011 deve ser no máximo  $7,5 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Desta forma, os resultados encontrados na tabela 2.5 atendem plenamente o previsto na legislação atual para ambos os sanitizantes. Estes resultados mostram, ainda, que a clorexidina pode ser substituída pelo ozônio sem maiores transtornos para a qualidade final do leite *in natura*.

Pinto *et al.* (2006) determinaram a contagem de bactérias mesofílicas e psicrotóficas em amostras de leite *in natura* refrigerado de tanques de fornecedores de um laticínio mineiro e os menores resultados encontrados

guardam consistência aos verificados na tabela 2.4. Para bactérias mesofílicas, verificaram uma contagem variando de  $2,5 \times 10^3$  a  $3,0 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e, para psicrotóricas, as contagens variaram de  $2,0 \times 10^2$  a  $1,0 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Concluíram que as altas contagens obtidas podem estar relacionadas a inadequados processos de higienização na ordenha e nos tanques de armazenamento e às falhas na produção.

A tabela 2.5 apresenta as médias aritméticas e desvio padrão do leite *in natura* colhido após a sanitização dos tetos das vacas com clorexidina 2% e água ozonizada na concentração de 2,0mg.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 2.5** – Efeito da clorexidina 2% e água ozonizada na concentração de 2,0mg.L<sup>-1</sup> sobre parâmetros físico-química do leite *in natura*.

Variável	Clorexidina	Ozônio	P
	média ± desvio padrão	média ± desvio padrão	
Proteína (%)	3,34 <sup>a</sup> ± 0,02	3,35 <sup>a</sup> ± 0,03	0,1293
Gordura (%)	3,42 <sup>a</sup> ± 0,10	3,38 <sup>a</sup> ± 0,11	0,4256
pH	6,58 <sup>a</sup> ± 0,06	6,61 <sup>a</sup> ± 0,07	0,0993

Médias que tiveram P<0,05 foram consideradas estatisticamente diferentes pelo Teste T-student.

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os sanitizantes. Observa-se que os resultados atendem a Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002) que prevê para os parâmetros proteína e gordura os valores mínimos de 2,9g/100g e 3,0g/100g, respectivamente. O leite *in natura* é levemente ácido com pH variando entre 6,5 e 6,7.

## 2.5 Conclusões

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que a água ozonizada, na concentração de 2,0mg.L<sup>-1</sup>, pode substituir a utilização de clorexidina 2% na sanitização da pele de tetos de vacas leiteiras da raça holandesa, sem prejuízo para a qualidade microbiológica e físico química do leite

in natura, indicando que o produto atende o previsto na Instrução Normativa N° 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

## 2.6 Agradecimentos

Agradeço à Fazenda da Aeronáutica pela possibilidade de utilização dos animais e pela doação dos sanitizantes utilizados no processo.

## 2.7 Referências Bibliográficas

AMARAL, L.A.; ISA, H.; DIAS, L.T.; ROSSI, O.D.J.; FILHO, A.N. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, 2004.

APHA, **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 18 ed. *American Public Health Association, Washington, DC*, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa n° 68, de 12 de dezembro de 2006. Dispõe sobre os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2006, Seção 1, p. 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Instrução Normativa nº51**, de 18 de setembro de 2002. Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Agricultura empresarial**. 2010. Disponível em: [https://i3gov.planejamento.gov.br/coi/textos/livro2/2.1 Agricultura empresarial.pdf](https://i3gov.planejamento.gov.br/coi/textos/livro2/2.1_Agricultura_empresarial.pdf). Acessado em: 13 jan. 2011.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; VERNEQUE, R.S. Contagem bacteriana da superfície de tetos de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 847-850, 2000.

CARVALHO *et al.*, Comunicado Técnico: O Brasil no cenário mundial de lácteos. **EMBRAPA Gado de Leite**, Juiz de Fora – MG, out., 2006 A.

CHAMBERS, J.V. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. (Ed). **Dairy Microbiology Handbook**. 3 ed. New York: Wiley-Interscience, p.39-90, 2002..

CHEMITEC, Agro-Veterinária. **Clorexidina-Cetrimida**. Disponível em: [http://www.chemitec.com.br/grande\\_porte/index.php](http://www.chemitec.com.br/grande_porte/index.php). Acessado em: 29 jun. 2011.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.45, p.172-207, 1982.

EMBRAPA, **EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA** – Gado de Leite. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/>. Acesso em: 25 jan. 2009.

FAGAN *et al.* Avaliação e Implantação de Boas Práticas nos Principais Pontos de Contaminação Microbiológica na Produção Leiteira. **Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, p. 83-92, 2005.

FONSECA, L.F.L; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle da Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.S.M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência Agrotécnica**, v. 29, n.1, p. 216-222, 2005.

GIBSON, H.; SINCLAIR, L.A.; BRIZUELA, C.M.; WORTON, H.L.; PROTHEROE, R.G. Effectiveness of Selected Premilking Teat-Cleaning Regimes in Reducing Teat Microbial Load on Commercial Dairy Farms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 295-300, 2008.

KHADRE, M.A., YOUSEF, A.E., KIM, J.G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**. Chicago, v.66, n.9, p.1242-1252, 2001B.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E., CHISM. G.W. Use of ozone to inactivate microorganisms on Lettuce. **Journal of Food Safety**, v.19, p.17-37, 1999A.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E., DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62, n.9, p.1071-1087, 1999B.

KOMOROWSKI, E.S. New Dairy Hygiene Legislation. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 2, p. 97-101, 2006.

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade Microbiológica de Leite *In natura* Refrigerado e Isolamento de Bactérias Psicrotóxicas Proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

SANTOS, C.D.M. ***Staphylococcus sp* e enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia-MG: perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos**, Uberlândia-MG, 2006, 54p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Área: Produção Animal), Universidade Federal de Uberlândia

SAS INSTITUTE 9.1 User.sguide. Carey: SAS Institute Inc., 2004. 1040p.

SIQUEIRA, K.B.; ALMEIDA, M.F. Projeções para o mercado lácteo mundial. **Panorama do Leite online**- Centro de Inteligência do Leite- CILeite [online], v. 4, n. 43, jun. 2010. Disponível em: <http://www.cileite.com.br/panorama/conjuntura42.html>. Acessado em: 15 jun. 2010.

### CAPÍTULO III. EFEITO DO BORBULHAMENTO DO GÁS OZÔNIO SOBRE A POPULAÇÃO DE PSICOTRÓFICOS, AERÓBIOS MESÓFILOS E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL NO LEITE *IN NATURA*

#### Resumo

O Agronegócio do Leite e seus derivados desempenham um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população, envolvendo vários setores da economia. Métodos que utilizam calor, pressões elevadas, meios físicos e gases com efeito antimicrobiano são empregados para reduzir a contaminação do leite e, conseqüentemente, aumentar sua vida de prateleira. A partir da exigência dos consumidores por produtos mais seguros, assim como tratamentos alternativos para redução da contaminação de alimentos, verificou-se o ozônio como uma alternativa para a eliminação de microrganismos em alimentos. Objetivou-se com esse trabalho estudar a ação do gás ozônio, por borbulhamento, como tratamento do leite *in natura*, avaliando a qualidade do mesmo, a partir das contagens das populações de microrganismos psicotróficos, contagem bacteriana total, bolores e leveduras, enterobactérias, pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp., bem como acompanhar a composição físico-química (gordura, proteína, acidez, densidade, acidez, extrato seco desengordurado e pH). Foram selecionadas 24 vacas leiteiras da raça holandesa não submetidas ao tratamento com antibióticos. Após a ordenha foram retirados 20 litros de leite do tanque reservatório, a partir do qual se retirou amostras para análises microbiológicas e físico-químicas iniciais. Foi realizado um delineamento experimental casualizado e os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Para as comparações entre as médias foram realizadas utilizando-se o Teste de Tukey. Para a contagem inicial (branco) de microrganismos aeróbios mesófilos (contagem total), enterobactérias, psicotróficos, *Staphylococcus* e bolores e leveduras foram encontradas  $1,53 \times 10^4$ ;  $2,47 \times 10^2$ ;  $1,03 \times 10^3$ ;  $1,47 \times 10^2$ ;  $5,03 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Não foi encontrada *salmonella* em nenhuma amostra de 25mL de leite. Após a aplicação do tratamento com gás ozônio na concentração de 1,5 mg L<sup>-1</sup> por 5 minutos não verificou-se diferenças significativas para as variáveis, porém no tratamento durante 10 minutos foi observado uma redução, com diferenças significativas (P<0,05), em relação a carga inicial, de 0,59; 0,53 e 0,25 ciclos logarítmicos para as contagens de enterobactérias, *Staphylococcus* sp. e bolores e leveduras, respectivamente. Após 15 minutos de exposição do leite *in natura* ao gás ozônio na concentração de 1,5 mg L<sup>-1</sup> verificou-se que as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, enterobactérias, psicotróficos e *Staphylococcus* sp. e bolores e leveduras foram de  $3,77 \times 10^3$ ;  $2,67 \times 10^1$ ;  $7,60 \times 10^2$ ;  $1,33 \times 10^1$  e  $1,67 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Os tratamentos com gás ozônio na concentração de 1,5 mg.L<sup>-1</sup>, nos tempos de 5, 10 e 15 minutos não demonstraram, para P<0,05, diferenças significativas para os parâmetros físico químicos estudados, exceto, para a densidade.

**Palavras-chave:** leite, ozônio, análises microbiológicas e físico químicas.

### CHAPTER III. OZONE GAS BUBBLING EFFECT ON THE POPULATION OF PSYCHOTROPHIC, AEROBIC MESOPHILIC AND TOTAL BACTERIAL COUNT IN RAW MILK

#### Abstract

Milk agribusiness and its derivatives play an important role in food supply, generation of employment and income, involving many economy areas. Methods that use heat, high pressure, physical means and gases with antimicrobial effect are employed to reduce the contamination of milk and consequently, increase its shelf life. With the consumers' demand for safer products, the need for a powerful antimicrobial and alternative treatments to reduce food contamination, ozone has been studied for the elimination of microorganisms in food. The objective of this work was to study the raw milk treatment by the action of ozone gas bubbling, evaluating its quality from the psychotrophic microorganisms population count, total bacterial count, yeasts and molds, *Enterobacteriaceae*, search for *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp., as well as monitor the physicochemical composition (fat, protein, acidity, density, acidity, dry defatted extract and pH). 24 Holstein dairy cows were selected, not subjected to antibiotics treatment. After milking, 20 liters of milk were taken from the reservoir tank, and then samples were extracted for initial microbiological and physicochemical analysis. We conducted a randomized experimental design and data were evaluated for normality of residuals and homogeneity of variance. Comparisons between means were performed using the Tukey test. For the initial count (white) of aerobic mesophilic microorganisms (total count) Enterobacteria, Psicotróficos, Staphylococcus, yeasts and molds were found  $1.53 \times 10^4$ ,  $2.47 \times 10^2$ ,  $1.03 \times 10^3$ ,  $1.47 \times 10^2$ ,  $5.03 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, respectively. Salmonella was not found in any milk sample. After applying the treatment with ozone gas at a concentration of 1.5 mg L<sup>-1</sup> for 5 minutes, there were no significant differences for the variables, but for the 10-minute treatment a reduction was observed with significant differences (P < 0.05), for the initial load of 0.59, 0.53 and 0.25 log-cycles for the counts of Enterobacteriaceae, *Staphylococcus sp.*, molds and yeasts, respectively. After 15 minutes of raw milk exposure in the ozone gas concentration of 1.5 mg L<sup>-1</sup>, it was verified that the counts of mesophilic aerobic, psychotrophic, *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus sp.*, yeasts and molds were  $3.77 \times 10^3$ ;  $2.67 \times 10$ ,  $7.60 \times 10^2$ ,  $1.33 \times 10$  and  $1.67 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, respectively. The treatments with ozone gas at a concentration of 1.5 mg L<sup>-1</sup> at 5, 10 and 15 minutes did not show (P < 0.05) significant differences in the studied physicochemical parameters, except for the density.

**Keywords:** milk, ozone, microbiological and physicochemical analysis.

### 3.1 Introdução

A partir da década de 1990, em nível mundial, observou-se a ocorrência de intensa competição, acentuada mudança tecnológica e difusão de informações, abertura comercial, regulamentação dos mercados, globalização e formação de blocos econômicos. Esses processos implicaram em transformações nos cenários mundial, nacional e regional, e seus impactos foram sentidos nas diversas atividades econômicas brasileiras, dentre elas a pecuária leiteira (GOBBI, 2006). Novas exigências foram delineadas para esse setor, tais como: maior tecnologia, conhecimento, qualidade e especialização (GOBBI, 2006; HUNT *et al.*, 2009).

Devido ao seu elevado teor de nutrientes, à disponibilidade de água e ao pH próximo a neutralidade, o leite constitui um substrato favorável ao desenvolvimento de microrganismos oriundos de processos fermentativos, o que é desejável para a indústria de laticínios. Em contrapartida, também favorece o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores, caso não haja um conjunto de ações preventivas ao longo da cadeia produtiva (DAHMER, 2006).

A qualidade microbiológica do leite *in natura* produzido em várias regiões do país é bem conhecida (BELMONTE e LAGO, 2004; PONSANO *et al.*, 2004), predominando as altas contagens de aeróbios mesófilos e de coliformes, que são indicativas de contaminação durante o processamento e armazenamento. Também é relatada a presença de microrganismos psicrotóxicos, que são deteriorantes e produtores de enzimas que comprometem a qualidade dos produtos finais, após o processamento. Estes microrganismos, que são incorporados ao leite em função da higienização deficiente em etapas da produção e durante o armazenamento em temperaturas de refrigeração não controladas, têm a oportunidade de multiplicarem-se e causarem deterioração no leite. Também é relatada freqüentemente a presença de coliformes totais e termotolerantes, sendo estes últimos originados de matéria fecal e podem estar presentes também no ambiente e contaminar o leite. Os coliformes, além de serem indicadores de higiene de produção, também podem produzir uma série de

enzimas que comprometem a qualidade dos derivados a que o leite cru é destinado (MORELLI, 2008).

Métodos que utilizam calor, pressões elevadas, meios físicos e gases com efeito antimicrobiano são empregados para reduzir a contaminação do leite e, conseqüentemente, aumentar sua vida de prateleira. Segundo Muir (1996), a maneira mais efetiva e simples de reduzir o número de bactérias no leite é aplicando um tratamento térmico. Entretanto, a eficácia do tratamento é determinada pela temperatura e tempo de aquecimento. Dos tratamentos térmicos, o mais amplamente empregado é a pasteurização que, embora elimine completamente as bactérias patogênicas do leite, não elimina esporos de bactérias psicrotróficas, principalmente bacilos, dentre os quais, *B. cereus*, *B. circulans* e *B. mycooides* que são capazes de se desenvolver em produtos refrigerados.

Com uma matéria-prima com esse perfil microbiológico, o beneficiamento desse produto dificilmente gera uma melhoria significativa desse parâmetro de qualidade. Assim, no Brasil é comum observar a comercialização de leite pasteurizado com baixa qualidade microbiológica, independente do tipo. Além dos problemas mencionados em relação ao leite *in natura*, que se mantêm no produto beneficiado, muitas vezes detecta-se um beneficiamento ineficiente, sem a redução satisfatória dos microrganismos deteriorantes e, além de muitas vezes ser relatada contaminação após o processo de pasteurização, que resultam em baixa qualidade do produto final (MONTEIRO et al, 2004).

Desta forma, existe a necessidade de um antimicrobiano potente, assim como tratamentos alternativos para redução da contaminação de alimentos. A indústria alimentícia está pesquisando sanitizantes que sejam efetivos contra patógenos e seguros para o uso em suas 'plantas'. Um dos candidatos é o ozônio que está sendo utilizado como sanitizante no tratamento de águas na Europa desde o início do século XX (KIM et al., 1999).

O ozônio é um gás incolor de odor pungente, instável e parcialmente solúvel em água, que se destaca por seu elevado poder oxidante. É um forte agente desinfetante com ação sobre uma grande variedade de organismos patogênicos, incluindo bactérias, vírus e protozoários, apresentando uma eficiência germicida que excede ao cloro (KIM *et al.*, 1999; KHADRE *et al.*, 2001).

O ozônio atua inicialmente na membrana celular, sendo a superfície da célula microbiana o primeiro alvo a ser atingido. Sua ação antimicrobiana é decorrente da oxidação de glicolipídeos, glicoproteínas e aminoácidos da parede celular, alterando a permeabilidade e causando sua rápida lise. O ozônio ataca também grupos sulfidril de enzimas, ocasionando o colapso da atividade enzimática celular. Além disso, sua ação sobre o material nuclear dos microrganismos altera as bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucléicos, como ocorre com alguns vírus, onde o ozônio destrói seu RNA além de alterar as cadeias polipeptídicas do cápsideo protéico (SILVEIRA, 2004).

O objetivo desse trabalho foi estudar a ação do gás ozônio, por borbulhamento, como tratamento do leite *in natura*, avaliando a qualidade do mesmo, a partir das contagens das populações de microrganismos psicotróficos, contagem bacteriana total, bolores e leveduras, enterobactérias, pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp., bem como acompanhar a composição físico-química do leite, com e sem o tratamento, a partir das determinações de gordura, proteína, acidez, densidade, extrato seco desengordurado e pH.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Matéria-Prima**

Foram selecionadas 24 vacas leiteiras da raça holandesa do rebanho da Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga (FAYS) com histórico (emitido pela Clínica do Leite da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz) de contagem de células somáticas (CCS) igual ou inferior a  $500.000 \text{ cel.mL}^{-1}$  e não submetidas ao tratamento com antibióticos durante os sete dias anteriores a realização dos

ensaios. Os animais foram ordenhados após tratamento de sanitização dos tetos com solução de clorexidina a 2%. O leite ordenhado foi mantido em tanque reservatório de aço inox, a temperatura de 5 °C, até o momento dos ensaios.

### 3.3 Gerador de Ozônio

O ozônio foi gerado a partir do equipamento Interozone – Purificador de Ar Modelo 485 RT, acoplado a um cilindro de oxigênio, com a finalidade de aumentar a concentração do gás no interior do equipamento (Figura 3.1). Foi adaptada à saída destinada ao ozônio gerado, com uma mangueira contendo em sua extremidade uma placa porosa de material sintetizado (similar as pedras porosas utilizadas em aquários), permitindo que o ozônio gerado fosse distribuído no leite em forma de micro bolhas, assim melhorando a transferência de massa da fase gasosa para fase líquida e, conseqüentemente, atingindo o conteúdo de forma homogênea com uma concentração final de 1,5 mg L<sup>-1</sup> de ozônio, conforme catálogo do fabricante.



**Figura 3.1** – Equipamento gerador de Ozônio fabricado pela empresa Interozone.

### 3.4 Tensoativo Polissorbato 80

Para o ensaio foi adicionado ao leite ordenhado e resfriado a 4°C, 0,1% de Polissorbato 80 (Tween 80<sup>®</sup>), como agente tensoativo, com a finalidade de

aumentar a exposição das populações de microrganismos e uma efetiva ação do gás ozônio.

#### **3.4.1 Tratamento e Amostragem do Leite com Ozônio Borbulhado**

Após a ordenha foram retirados 20 litros de leite do tanque reservatório, mantidos a uma temperatura de 4°C e transferidos para um tanque de aço inox menor, sanitizado previamente com ácido peracético. Nesse ponto foram retiradas amostras para análises microbiológicas e físico-químicas, com a finalidade de se avaliar a qualidade inicial do leite.

A seguir foi adicionado ao tanque, 20 mL de Polissorbato 80 e, com o auxílio de um agitador mecânico, manteve-se a homogeneização da amostra durante todo o ensaio. Novas amostras foram retiradas para análises microbiológicas e físico-químicas, 5 minutos após a adição do tensoativo.

A placa para borbulhar o ozônio foi então mergulhada no tanque, a geração de ozônio gasoso foi ativada e a agitação mantida. Nesse momento foi iniciado o registro do tempo de aplicação do tratamento.

Foram retiradas amostras do leite nos tempos 5, 10 e 15 minutos, após o início da aplicação do ozônio a concentração de 1,5 mgL<sup>-1</sup>, sendo realizadas análises microbiológicas e físico-químicas das mesmas, para avaliação da eficácia do tratamento nos diferentes tempos de exposição.

As análises foram realizadas em triplicata e o ensaio em duplicata.

#### **3.4.2 Meios de Cultura e Análises Microbiológicas**

Para a contagem de aeróbios mesófilos e bactérias psicrótróficas foi utilizado o Ágar Plate Count (PCA - DIFCO®), para bolores e leveduras, foi utilizado o Ágar Potato Dextrose (PDA - DIFCO®), para enterobactérias e *Staphylococcus sp.* foram utilizados respectivamente Ágar Violet Red Bile Dextrose (VRBA - DIFCO®) e Ágar Baird Parker (BP - DIFCO®) e para *Salmonella*

*sp.* foram utilizados caldos de enriquecimento lactosado (DIFCO®) e seletivo Rapaport (DIFCO®), seguidos de Ágar Verde Brilhante (VB - DIFCO®) e Ágar Salmonella – Shigella (SS DIFCO®) para isolamento.

#### **3.4.2.1 Preparo da Diluição Decimal Seriada**

Das amostras de leite foram tomadas alíquotas de 25 mL e diluídas em 225 mL de solução salina peptonada 0,1% e, a partir desta suspensão, foram preparadas diluições decimais seriadas.

#### **3.4.2.2 Contagem de Microrganismos**

Foram realizadas, no laboratório de microbiologia do Laticínio da FAYS, a enumeração de microrganismos psicotróficos, aeróbios mesófilos (contagem bacteriana total), bolores e leveduras e de enterobactérias, pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp., segundo metodologia descrita pela APHA, 1992.

As contagens dos microrganismos pesquisados foram determinadas em triplicata transferindo-se 1 mL de cada diluição preparada a partir das amostras de leite *in natura*, para placas de Petri nas quais foram adicionados os meios de cultura específicos, previamente fundidos e resfriados a 45-46°C. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas para aeróbios mesófilos, enterobactérias, *Staphylococcus sp.*, a 22°C por 48 horas para bolores e leveduras e, a 7°C por 10 dias para psicotróficos (APHA, 1992).

Após os períodos de incubação foram contadas as placas com 25 a 250 colônias e aplicados os respectivos fatores de correção para cada diluição. Os resultados foram expressos em UFC.mL<sup>-1</sup>.

Pesquisa de *Salmonella* spp.: das amostras de leite foram tomadas alíquotas de 25 mL que foram homogeneizadas em 225 ml de Caldo Lactosado e incubados a 35°C por 48 horas. Após a incubação, uma alíquota de 1,0 ml do

crescimento foi transferido para caldo Rappaport e incubado a  $45,5\pm 0,2^{\circ}\text{C}$  em banho maria por 24 horas. Após a incubação o crescimento foi repicado em Ágar Verde Brilhante e Ágar SS, incubados a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas (APHA, 1992). Uma média de 3 a 4 colônias típicas de cada ágar, foram selecionadas para confirmação por meio de provas bioquímicas em Ágar Kliger Ferro, Caldo Lisina e Caldo Uréia, Sistema Bac Tray I e II (Difco). A sorologia seria seguida com soros polivalentes “O” e “H”, no entanto, das colônias suspeitas identificadas nenhuma foi positiva para *Salmonella sp.*

#### **3.4.2.3 Análises Físico-Químicas**

No Laboratório do Laticínio da FAYS, o leite foi avaliado quanto à composição de proteína, gordura, acidez, e densidade, seguindo as exigências da Instrução Normativa nº 51/2002. Foi utilizado o Ekomilk M, modelo Milkama Kam 98-2A. Este equipamento tem seu uso aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O pH foi medido utilizando um pHgâmetro de bancada, marca Quimis modelo Q400A.

### **3.5 Análises Estatísticas**

Foi realizado um delineamento experimental casualizado com 5 tratamentos (branco – sem tratamento, leite com Tween®, leite com Tween® e ozônio por 5 minutos, leite com Tween® e ozônio por 10 minutos, leite com Tween® e ozônio por 15 minutos) e 3 repetições para microbiologia. Para análise físico-química cada tratamento foi composto por 10 repetições, onde cada repetição foi constituída pela média das análises em triplicata.

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias e os dados que não respeitaram as premissas estatísticas foram submetidos à transformação logarítmica [ $\text{Log}(x+1)$ ]. Os dados originais ou transformados, quando este último procedimento foi necessário, foram submetidos à análise de variância que separou como causa de variação apenas o

efeito de tratamento, as comparações entre as médias foram realizadas utilizando-se o Teste de Tukey através do procedimento GLM (*General Linear Model*) do pacote estatístico SAS (SAS, 2004). Para separação dos efeitos de tratamentos foi utilizada a metodologia dos contrastes como apresentado na tabela 3.1.

**Tabela 3.1** – Esquema dos contrastes ortogonais utilizados para estudo dos efeitos dos tratamentos

Efeito	branco	leite com Tween®	leite com Tween® e ozônio por 5 minutos	leite com Tween® e ozônio por 10 minutos	leite com Tween® e ozônio por 15 minutos
branco X Tween®	1	-1	0	0	0
Tween® X Ozônio	0	3	-1	-1	-1
Linear de Ozônio	0	-3	-1	1	3
Quadrático de Ozônio	0	1	-1	-1	1

O modelo matemático utilizado foi:

$$y_{ij} = m + t_i + e_{ij} \text{ com } i = 1, 2, \dots, 5 \text{ e } j = 1, 2, 3.$$

Onde:

$y_{ij}$  é o valor observado da  $j$ -ésima parcela (repetição) que recebeu o tratamento  $i$ ;

$m$  é uma constante (média geral) comum a todas as observações;

$t_i$  é o efeito do  $i$ -ésimo tratamento aplicado na parcela,

$e_{ij}$  é o efeito dos fatores não controlados na parcela.

As reduções decimais (NRD) foram calculadas por meio da seguinte fórmula:

$$\text{NRD (Logredução)} = \log_{10}(\text{contagem inicial}) - \log_{10}(\text{contagem após tratamento}).$$

### 3.6 Resultados e Discussão

#### 3.6.1 Tratamentos com Ozônio

Os resultados para o logaritmo das contagens de microrganismos obtidos no ensaio para determinação das populações de aeróbios mesófilos, psicotróficos, enterobactérias, *Staphylococcus* sp. e *Salmonella* sp., durante tratamento com gás ozônio na concentração de 1,5 mg L<sup>-1</sup>, são demonstrados na tabela 3.2.

**Tabela 3.2** – Médias (Log UFC/mL) e respectivos desvios padrão das contagens de microrganismos presentes no leite *in natura* durante tratamento com gás ozônio a 1,5 mg L<sup>-1</sup>.

Variável	Branco	Leite com Tween®	Leite com Tween® e ozônio por 5 minutos	Leite com Tween® e ozônio por 10 minutos	Leite com Tween® e ozônio por 15 minutos
Contagem total	4,18 <sup>a</sup> ± 0,03	3,78 <sup>a</sup> ± 0,58	3,48 <sup>a</sup> ± 0,58	3,60 <sup>a</sup> ± 0,02	3,58 <sup>a</sup> ± 0,02
Enterobactérias	2,39 <sup>a</sup> ± 0,08	2,41 <sup>a</sup> ± 0,10	2,26 <sup>a</sup> ± 0,05	1,81 <sup>b</sup> ± 0,04	1,43 <sup>c</sup> ± 0,10
Psicotróficos	3,01 <sup>a</sup> ± 0,03	3,01 <sup>a</sup> ± 0,03	2,93 <sup>ab</sup> ± 0,06	2,93 <sup>ab</sup> ± 0,02	2,88 <sup>b</sup> ± 0,03
<i>Staphylococcus</i> sp	2,16 <sup>a</sup> ± 0,09	2,10 <sup>a</sup> ± 0,04	2,00 <sup>a</sup> ± 0,09	1,64 <sup>b</sup> ± 0,05	1,14 <sup>c</sup> ± 0,16
Bolores e leveduras	2,70 <sup>a</sup> ± 0,04	2,68 <sup>a</sup> ± 0,03	2,63 <sup>a</sup> ± 0,02	2,45 <sup>b</sup> ± 0,04	2,22 <sup>c</sup> ± 0,08

Médias acompanhadas de letras diferentes entre si diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (P<0,05)

Para a contagem inicial (branco) de microrganismos aeróbios mesófilos, enterobactérias, psicotróficos, *Staphylococcus* e bolores e leveduras foram encontradas 1,53X10<sup>4</sup>; 2,47X10<sup>2</sup>; 1,03X10<sup>3</sup>; 1,47X10<sup>2</sup>; 5,03X10<sup>2</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Não foi encontrada salmonela em nenhuma amostra de leite.

De acordo com o Ministério da Agricultura e Abastecimento, o máximo permitido, quanto aos parâmetros microbiológicos, para contagem padrão em placas e psicotróficos é de 3,0 x 10<sup>5</sup> e 3,0 x 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Desta forma, os valores encontrados neste trabalho estão de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2002).

Observa-se, na tabela 3.1, que a adição do tensoativo, Tween 80, não provocou alterações significativas para  $P < 0,05$  em nenhum dos microrganismos estudados.

Após a aplicação do tratamento com gás ozônio na concentração de  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$  por 5 minutos não se verificou diferenças significativas para as variáveis, porém no tratamento durante 10 minutos foi observado uma redução, com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ), em relação a carga inicial, de 0,59; 0,53 e 0,25 ciclos logarítmicos para as contagens de enterobactérias, *Staphylococcus sp.* e bolores e leveduras, respectivamente.

No tratamento com o gás ozônio durante 15 minutos notaram-se resultados com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ), em relação à amostra controle (branco), de 0,97; 0,13; 1,04 e 0,48 ciclos logaritmos para enterobactérias, psicotróficos, *Staphylococcus sp* e bolores e leveduras, respectivamente.

Desta forma, após 15 minutos de exposição do leite *in natura* ao gás ozônio na concentração de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  verificou-se que as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, enterobactérias, psicotróficos, *Staphylococcus sp.* e bolores e leveduras foi de  $3,77 \times 10^3$ ;  $2,67 \times 10^3$ ;  $7,60 \times 10^2$ ;  $1,33 \times 10^1$  e  $1,67 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Assim, as reduções para estes mesmos microrganismos, em relação às contagens iniciais, são de 0,61; 0,97; 0,13; 1,04 e 0,48 ciclos logarítmicos, respectivamente.

Ao comparar o binômio concentração de ozônio X tempo de contato a partir de outras matérias primas/alimentos constataram-se resultados semelhantes ao deste trabalho com os encontrados por Ketteringham *et al.* (2006) que investigaram o efeito da imersão de pimentões verdes pré-cortados em água ozonizada em distintas concentrações de ozônio (0.30–0.36, 0.38–0.45, e 3.85–3.95 mg. L<sup>-1</sup>) e tempo de imersão de 10 minutos sobre a contagem de microrganismos naturais desse vegetal. As reduções máximas atingidas foram de

0,66 e 0,72 ciclos logarítmicos de UFC.g<sup>-1</sup> para amostras lavadas somente com água e para amostras higienizadas com água ozonizada, respectivamente.

Comparando os resultados desta pesquisa com a eficiência da pasteurização no leite, para a eliminação de microrganismos patogênicos e banais (BRASIL, 2002) observamos que o ozônio não foi totalmente eficiente para substituir este processo.

Diferentemente dos resultados aqui encontrados, existem trabalhos que comprovam uma maior eficiência do ozônio na eliminação de microrganismos em alimentos como a pesquisa realizada por Achen e Yousef (2001) que determinou a eficácia do ozônio na inativação de *E. coli* O157:H7 inoculada em maçãs mediante dois tratamentos. No primeiro borbulhou-se o ozônio durante a lavagem das maçãs e no segundo imergiram-se estas em água pré-ozonizada (24-25 mg/L), ambos utilizando um tempo de exposição de até 3 minutos. O trabalho resultou em uma redução na contagem de *E. coli* O157:H7 de 3,7 e 2,6 ciclos logarítmicos para o primeiro e segundo tratamentos, respectivamente. Novake Yuan (2004) conseguiram uma redução de células vegetativas de *Clostridium perfringens* na superfície de bifes industrializados de 5,59 para 3,50 ciclos logarítmicos após combinar tratamentos com água ozonizada (5 ppm) e posterior aquecimento a 55°C.

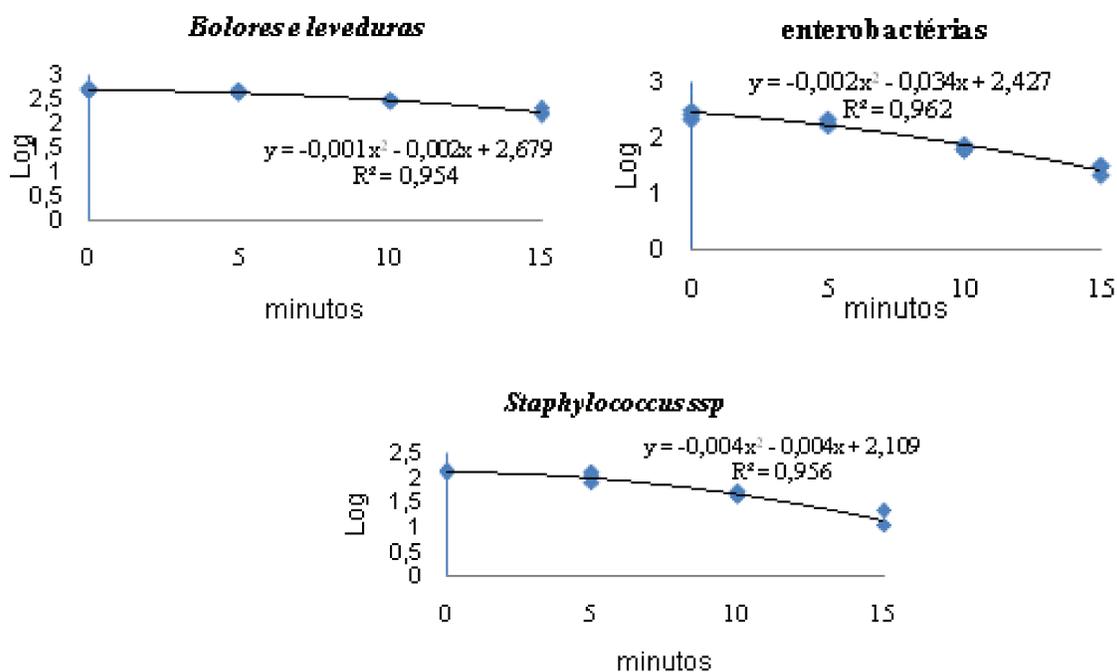
Valores, consideravelmente, maiores em relação à redução de microrganismos estudados neste trabalho foram verificados por Cavalcante (2007) que avaliou as populações de aeróbios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, bolores e leveduras, coliformes totais e coliformes termotolerantes em alfaces americanas, utilizando 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, e obteve reduções de 4,07; 3,36; 3,20; 2,18 e 2,18 ciclos logarítmicos, respectivamente, em 3 minutos de exposição com o sanitizante.

Os resultados das interações lineares e quadráticas entre os diversos tratamentos são apresentados na tabela 3.3.

**Tabela 3.3** – Probabilidades dos contrastes ortogonais para parâmetros microbiológicos do leite *in natura* submetido ao tratamento com gás ozônio na concentração de 1,5 mg.L<sup>-1</sup>.

Variável	Probabilidade			
	branco X Tween®	Tween® X Ozônio	Linear de Ozônio	Quadrático de Ozônio
Contagem Total	0,20	0,00	0,62	0,53
Enterobactérias	0,77	<,0001	<,0001	0,03
Psicotróficos	1,00	0,00	0,00	0,45
<i>Staphylococcus sp</i>	0,47	<,0001	<,0001	0,00
Bolores e leveduras	0,50	<,0001	<,0001	0,01

De acordo com a tabela 3.3 verifica-se que não houve efeito significativo ( $P > 0,05$ ) para o tratamento branco e Tween®, no que diz respeito às populações de aeróbios mesófilos (Contagem Total), enterobactérias, psicotróficos, *Staphylococcus* e bolores e leveduras. Porém, houve diferença significativa entre Tween® e ozônio para todas as variáveis.



**Figura 3.2** – Apresentação gráfica da função quadrática das análises microbiológicas nas amostras do leite *in natura* nos diferentes tratamentos com gás ozônio.

O sanitizante diminuiu significativamente ( $P < 0,05$ ) o Log da contagem de todos os microrganismos estudados e apresentou interações lineares para todos eles e quadráticas apenas para as enterobactérias, *Staphylococcus* e os bolores e leveduras, de acordo com o apresentado na figura 3.2.

Os resultados das análises físico-químicas para o leite *in natura* tratado com gás ozônio na concentração de  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , durante os tempos 5, 10 e 15 minutos estão apresentados na Tabela 3.4.

O leite pasteurizado, para ser considerado apto para o consumo e de boa qualidade, deve apresentar características sensoriais normais, teor de gordura original para leite integral, 3% de gordura para leite padronizado, acidez entre 14 a  $18^{\circ}\text{D}$ , estabilidade ao teste de Alizarol 72% (v.v –1), densidade relativa ( $15/15^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{g.mL}^{-1}$ ) entre 1,028 a 1,034, extrato seco desengordurado mínimo de 8,4% e índice crioscópico máximo de  $-0,530^{\circ}\text{H}$  (BRASIL, 2002).

**Tabela 3.4** – Médias e respectivos desvios padrão das análises físico químicas no leite *in natura* durante tratamento com gás ozônio a  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ .

variável	branco	leite com Tween®	leite com Tween® e ozônio por 5 minutos	leite com Tween® e ozônio por 10 minutos	leite com Tween® e ozônio por 15 minutos
Proteína (%)	$3,37^a \pm 0,02$	$3,39^a \pm 0,03$	$3,39^a \pm 0,03$	$3,38^a \pm 0,04$	$3,35^a \pm 0,04$
Gordura (%)	$3,67^a \pm 0,14$	$3,64^a \pm 0,10$	$3,64^a \pm 0,10$	$3,66^a \pm 0,13$	$3,62^a \pm 0,06$
Densidade	$1,0329^a \pm 0,00$	$1,0324^{ab} \pm 0,01$	$1,0324^{ab} \pm 0,00$	$1,0321^b \pm 0,00$	$1,0329^a \pm 0,00$
ESD (%)	$8,69^a \pm 0,08$	$8,70^a \pm 0,07$	$8,70^a \pm 0,07$	$8,77^a \pm 0,09$	$8,72^a \pm 0,05$
Acidez ( $^{\circ}\text{D}$ )	$15,87^a \pm 0,76$	$16,10^a \pm 0,80$	$16,10^a \pm 0,80$	$15,90^a \pm 0,74$	$15,8^a \pm 0,71$
pH	$7,85^a \pm 0,07$	$7,88^a \pm 0,08$	$7,88^a \pm 0,08$	$7,88^a \pm 0,09$	$7,89^a \pm 0,08$

Médias acompanhadas de letras diferentes entre si diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ( $P < 0,05$ )

Observa-se na tabela 3.4 que todos os parâmetros, durante o período de experimento, mantiveram-se dentro do previsto na legislação vigente (BRASIL, 2002). Verifica-se, ainda, que a adição do Polissorbato não propiciou alterações significativas ( $P < 0,05$ ) no produto.

Os tratamentos com gás ozônio na concentração de  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , nos tempos de 5, 10 e 15 minutos não demonstraram, para  $P < 0,05$ , diferenças significativas para os parâmetros físico químicos estudados, exceto, para a densidade.

A menor densidade foi obtida quando o leite foi tratado com Tween® e ozônio por 10 minutos ( $P < 0,05$ ), e os outros tratamentos não foram diferentes entre si ( $P > 0,05$ ).

A densidade do leite deve apresentar-se entre 1,028 e 1,034, segundo recomendação da legislação vigente (BRASIL, 2002). Valores abaixo dessa faixa podem indicar adição de água, e valores acima, fraude por adição de outras substâncias ou desnate do leite.

Apesar de verificarem-se, neste trabalho, diferenças significativas entre os tempos de tratamento com ozônio para o parâmetro densidade é interessante salientar que os valores medidos permaneceram dentro dos padrões legais (BRASIL, 2002).

Os dados desta pesquisa diferem-se dos encontrados por Oliveira *et al.* (2008) que estudaram o efeito do ozônio, sobre a composição centesimal e perfil de ácidos graxos em filés de tilápia, e foi observado que a composição centesimal foi afetada significativamente pelo tratamento com ozônio (os filés perderam água e aumentaram a concentração de proteína).

### **3.7 Conclusões**

A partir dos resultados obtidos concluí-se que a contagem inicial de microrganismos no leite *in natura* apresentou-se dentro dos padrões legais ora vigentes e a aplicação do ozônio na concentração de  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , nos tempos de 5, 10 e 15 minutos, não comprometeu a composição físico-química (proteína, gordura, ESD, densidade, acidez e pH) do produto.

Porém, não foi possível, com a proposta de estudo apresentada, substituir completa ou parcialmente, a pasteurização pela aplicação do gás ozônio no leite

### 3.8 Agradecimentos

Agradeço à Fazenda da Aeronáutica pela possibilidade de utilização das instalações do laticínio e pela doação dos utensílios e produtos utilizados no processo.

### 3.9 Referências Bibliográficas

ACHEN, M.; YOUSEF, A. E. Efficacy of Ozone Against *Escherichia coli* O157:H7 , on Apples. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 9, p. 1380-1384, 2001.

AJZENTAL, A. Caminhos do leite: da ordenha ao consumidor. **Leite e Derivados**, São Paulo, v.3, n.18, p.29-40, 1994.

APHA, Standard methods for the examination of water and wastewater. 18 ed. *American Public Health Association, Washington, DC*, 1992.

BELMONTE, E.A.; LAGO, N.C.M.R. Pesquisa de microrganismos indicadores em leite pasteurizado integral comercializado nas cidades de Ribeirão Preto e Sertãozinho, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Anais Passo Fundo: UFP, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal** - RIISPOA. Brasília: SDA, 1952. p. 124.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Instrução Normativa nº51**, de 18 de setembro de 2002. Brasília, 2002.

CAVALCANTE, D.A. **Avaliação do Tratamento com Água Ozonizada para Higienização de Alface (*Latuca sativa*)**. Campinas, 2007, 91p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

CERQUEIRA M.M.O.P; LEITE, M.O. Doenças Transmissíveis pelo Leite e Derivados. Caderno Escolar Técnico Veterinária, Belo Horizonte, v.13, n.16, p. 39-62, 1995.

DAHMER, A.M. **Gestão da Qualidade na indústria de leite do Estado de Mato Grosso do Sul**, Campo Grande, 2006, 220 p. Dissertação (Mestrado em Agronegócios), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

EMBRAPA, **EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA** – Gado de Leite. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/>. Acesso em: 25 jan. 2009.

GOBBI, W.A O. **A pecuária leiteira na comunidade de Canoa – Ituiutaba (MG): persistência e resistência**, Uberlândia -MG, 2006, 126 p. Dissertação (Mestrado em Geografia), Instituto de Geografia, Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

HUNT, D. M.; RIBEIRO, R., SHIKI, S.; BIASI, D.; FARIA, A.P. Comparação de indicadores de desempenho de produtores de leite localizados dentro e fora do assentamento de reforma agrária no triângulo mineiro. *Revista de Economia e Sociologia Rural*. Brasília, v.47, n.1, p-211-248, 2009.

JAYARAO, B.M.; DONALDSON, S.C.; STRALEY, B.A.; SAWANT, A.A.; HEGDE, N.V.; BROWN, J.L. A Survey of Foodborne Pathogens in Bulk Tank Milk and Raw Milk Consumption Among Farm Families in Pennsylvania. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2451-2458, 2006.

KETTERINGHAM, L.; GAUSSERES, R.; JAMES, S.J.; JAMES, C. Application of aqueous ozone for treating pre-cut green peppers (*Capsicum annum* L.) **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 1, p. 104-111, 2006.

KHADRE, M.A., YOUSEF, A.E. Decontamination of a multilaminated aseptic food packaging material and stainless steel by ozone. **Journal of Food Safety**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2001.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E., CHISM. G.W. Use of ozone to inactivate microorganisms on Lettuce. **Journal of Food Safety**, v.19, p.17-37, 1999.

MONTEIRO, A.A.; VACCARELLI, E.R.S.; BARROS, M.A.F. Aspectos higiênico-sanitários no fluxograma de uma usina de beneficiamento de leite: interferência sobre a qualidade do produto final. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. Anais...Passo Fundo: UFP, 2004.

MORELLI, A.M F. **Escherichia coli O157:H7: ocorrência em ambiente de produção de leite na microrregião de Viçosa, adesão em diferentes superfícies e resistência a sanitizantes**, Viçosa -MG, 2008, 173 p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa.

MUIR, D. D. The shelf life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, n. 1, p. 24-32, 1996.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F.E.V. Microbiological quality of Milk determined by production characteristics. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v.29, n. 2, p.386-390, abr-jun, 2009.

NOVAK, J.S.; YUAN, J.T.C. Increased Inactivation of Ozone-Treated *Clostridium perfringens* Vegetative Cells and Spores on Fabricated Beef Surfaces Using Mild Heat. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 2, p. 342-346, 2004.

PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; JORGE, A.F.L. Variação sazonal e correlação entre propriedades de leite utilizados na avaliação da qualidade. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.64, p. 35-38, 1999.

PONSANO, E.H.G. et al. Adequação do leite produzido na região de Araçatuba aos padrões preconizados pela IN51 - MARA. Parte 2: leite individual. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. Anais...Passo Fundo: UFP, 2004.

OLIVEIRA, N. M. S.; OLIVEIRA, W. R. M.; NASCIMENTO, L. C.; SILVA, J. M. S. F.; VICENTE, E.; FIORINI, J. E.; BRESSAN, M. C. Avaliação Físico-Química de Filés de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) Submetidos à Sanitização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 83-89, 2008.

SAS INSTITUTE 9.1 User.sguide. Carey: SAS Institute Inc., 2004. 1040p.

SILVEIRA, I. C. T. **Cloro e ozônio aplicados a desinfecção de efluente hospitalar tratado em contadores biológicos rotatórios, com avaliação de efeitos tóxicos em DAPHNIA SIMILIS**. 2004. Dissertação (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

WALSTRA *et al.* **Dairy Science and Technology**, 2<sup>a</sup> ed., Boca Raton, Florida: EUA, 2006, 781p.

ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; JUNIOR, W.S.; ZANELA, C.; MARQUES, L.T.; MARTINS, P.R.G. Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 1, p. 153-159, 2006.

ZOCCAL, R.; STOCK, L.A.; REIS FILHO, R.J.C.; CARNEIRO, A.V.; MARTINS, P.C.; CARVALHO, G.R. Agropolo Sobral. In: ZOCCAL, R.; MARTINS, P.C.; CARNEIRO, A.V.; FILHO, R.J.C.R.; NOGUEIRA, J.N.A. **Competitividade da cadeia produtiva do leite no Ceará: produção primária**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2008. p. 341-364. Disponível em: <http://www.prodemb.cnptia.embrapa.br/>, acessado em: 13 jan. 2010.

## CAPÍTULO IV. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE QUEIJO MINAS FRESAL TRATADO COM ÁGUA OZONIZADA

### Resumo

O queijo minas frescal é um produto genuinamente brasileiro, sendo um dos mais importantes e consumidos no Brasil. É um alimento fresco, de alta umidade, suscetível à rápida deterioração microbiana, o que resulta em uma vida de prateleira curta. O ozônio é um agente antimicrobiano com a característica de inativar microrganismos rapidamente, reagindo com elementos vitais da célula. O presente estudo teve por objetivo estudar os efeitos da água ozonizada na estabilidade do queijo Minas Frescal, avaliando o aumento das populações de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes totais e termotolerantes, bactérias lácticas, bolores e leveduras e *Staphylococcus sp.*, bem como alteração nos parâmetros físico-químicos de gordura, proteína, acidez e pH, durante a estocagem por 30 dias em refrigeração. Foram analisadas 39 peças (250g) de queijo Minas Frescal, divididas em três grupos de 13 peças cada, para realização dos tratamentos, sendo o grupo 0: imersão em água destilada e filtrada; grupo 1: imersão em água ozonizada a 2 mg. mL<sup>-1</sup> por um período de contato de 1 minuto e, grupo 2: imersão em água ozonizada a 2 mg. mL<sup>-1</sup> por um período de contato de 2 minutos. Para microbiologia realizou-se experimento inteiramente casualizado, fatorial 3 x 8 e para a físico-química utilizou-se o fatorial 3 x 5, com 3 repetições para cada tratamento. Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias. Não foi observada a presença de enterobactérias, coliformes totais e termotolerantes e *Staphylococcus sp.*, nas amostras analisadas. No tratamento com água ozonizada na concentração de 2,0mg.L<sup>-1</sup> (tempo 0), as reduções decimais para as populações de aeróbios mesófilos, bactérias lácticas e bolores e leveduras, imediatamente após a aplicação da água ozonizada na concentração de 2,0mg.L<sup>-1</sup>, durante 2 minutos foi de 1,53, 1,90 e 2,34 ciclos logaritmos, respectivamente. Houve interferência do tempo de exposição da água ozonizada em relação a eliminação dos microrganismos, com efeito quadrático, sendo que os microrganismos foram eliminados com maior eficiência nos tempos de 1,56 até 1,81 minutos, para os aeróbios mesófilos, e 1,57 até 2,21 minutos, para as bactérias lácticas. O ozônio na concentração de 2,0mgL<sup>-1</sup>, não comprometeu a composição físico-química (proteína, gordura, acidez e pH) do queijo.

**Palavras-chaves:** queijo minas frescal; ozônio; tempo de estabilidade.

## CHAPTER IV. STABILITY EVALUATION OF MINAS FRESCAL CHEESE TREATED WITH OZONATED WATER

### Abstract

minas frescal cheese is a genuine Brazilian product, one of the most important and consumed in Brazil. It is a fresh and white type of cheese, with high humidity, susceptible to rapid microbiological spoilage, which results in a short shelf life. Ozone is an antimicrobial agent that rapidly inactivates microorganisms by reacting with vital elements of the cell. This study aimed to study the effects of ozonated water on Frescal Minas cheese stability, evaluating the increase in populations of aerobic mesophiles, enterobactérias, total coliforms and thermotolerants, lactic bacteria, yeasts, molds and *Staphylococcus* s sp. Adding to that, changes in the physicochemical parameters of fat, protein, acidity and pH during 30 days storage under refrigeration. We analyzed 39 pieces (250g) of minas frescal cheese, divided into three groups (13 pieces) to carry out the treatments - group 0: immersion in distilled and filtered water; Group 1: immersion in ozonated water at 2 mg. mL<sup>-1</sup> for a contact time of 1 minute and group 2: immersion in ozonated water at 2 mg. mL<sup>-1</sup> for a period of 2 minutes contact. For microbiology we did a completely randomized experiment, factorial 3 x 8 and for the physicochemical analysis we used the 3 x 5 factorial design with three repetitions for each treatment. The data were assessed for normality and homogeneity of variances. We did not observe the presence of *Enterobacteriaceae*, total coliforms, thermotolerants and *Staphylococcus* sp. in the analyzed samples. For the treatment with ozonated water at a concentration of 2.0 mg.L<sup>-1</sup> (time 0), the decimal reductions for the populations of aerobic mesophiles, lactic bacteria, yeasts and molds, immediately after application for 2 minutes were 1.53, 1.90 and 2.34 log-cycles, respectively. There was interference from the exposure time of the ozonated water over the elimination of microorganisms, with a quadratic effect, and the microorganisms were eliminated more efficiently in 1.56 to 1.81 minutes for the aerobic mesophiles, and 1.57 up to 2.21 minutes for the lactic bacteria. The ozone concentration of 2.0 mgL<sup>-1</sup> did not compromise the physicochemical composition (protein, fat, acidity and pH) of the cheese.

**Keywords:** minas frescal cheese, ozone, stability time.

#### 4.1 Introdução

O queijo minas frescal, produto genuinamente brasileiro, teve sua fabricação iniciada no século XVIII, no estado de Minas Gerais (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS- EPAMIG, 1987; CAMPOS, 2001). É um queijo irregular, tendo em vista não apresentar, de forma definida, propriedades de consistência, textura, sabor, durabilidade, rendimento e composição físico-química, uma vez não ter sido consolidada uma padronização, principalmente, devido a diversidade nos processos de fabricação (ABIQ, 2011).

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 1997) o queijo minas frescal é um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, completada ou não com ação de bactérias lácticas específicas, sendo classificado como um queijo semigordo, de alta umidade, para consumo fresco, com consistência branda e macia, com ou sem olhaduras mecânicas, de sabor suave a levemente ácido, sem ou com crosta fina, de forma cilíndrica e com peso de 0,3 a 5kg. Em 2004 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) realizou a correção da classificação da umidade do queijo Minas Frescal, considerando-o como um queijo de muito alta umidade (>55%) (BRASIL, 2004).

Ainda para o MAPA (BRASIL, 1996), conforme portaria nº 146, as tolerâncias para os padrões microbiológicos vigentes do queijo minas frescal são de  $1 \times 10^3$  UFC para coliformes totais/g,  $5 \times 10^3$  UFC para coliformes fecais/g, *Staphylococcus* coagulase positiva/g,  $5 \times 10^3$  UFC de fungos e leveduras/g e ausência de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em 25g da amostra. Já para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) as tolerâncias são de  $5 \times 10^2$  UFC de coliformes de origem fecal/g e *Staphylococcus* coagulase positiva/g, e ausência em 25g de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* (Brasil, 2001).

Com relação à estabilidade, o queijo minas frescal apresenta um fator agravante, pois, além de ser um produto fresco com alto teor de umidade, não é

submetido à cura e apresenta baixa quantidade de sal. Estas características geram condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos, e, quando somadas à manipulação inadequada durante a fabricação, tornam o produto um meio propício para problemas de segurança alimentar, além da consequente diminuição de sua vida de prateleira (CARVALHO, 2003).

Assim, novas tecnologias devem ser buscadas para o ganho de qualidade e vida útil do queijo minas frescal. O ozônio vem sendo pesquisado para ser utilizado na indústria de alimentos como um antimicrobiano (KIM *et al.*, 1999B). O ozônio é potente agente sanitizante com alta reatividade e decomposição espontânea em produtos não tóxicos. Pode ser aplicado na forma líquida e gasosa nos alimentos. Sua ação se baseia na inativação de microrganismos reagindo com elementos vitais da célula (enzimas intracelulares, ácidos nucleicos e membranas celulares) (KIM *et al.*, 1999A; KHADRE *et al.*, 2001).

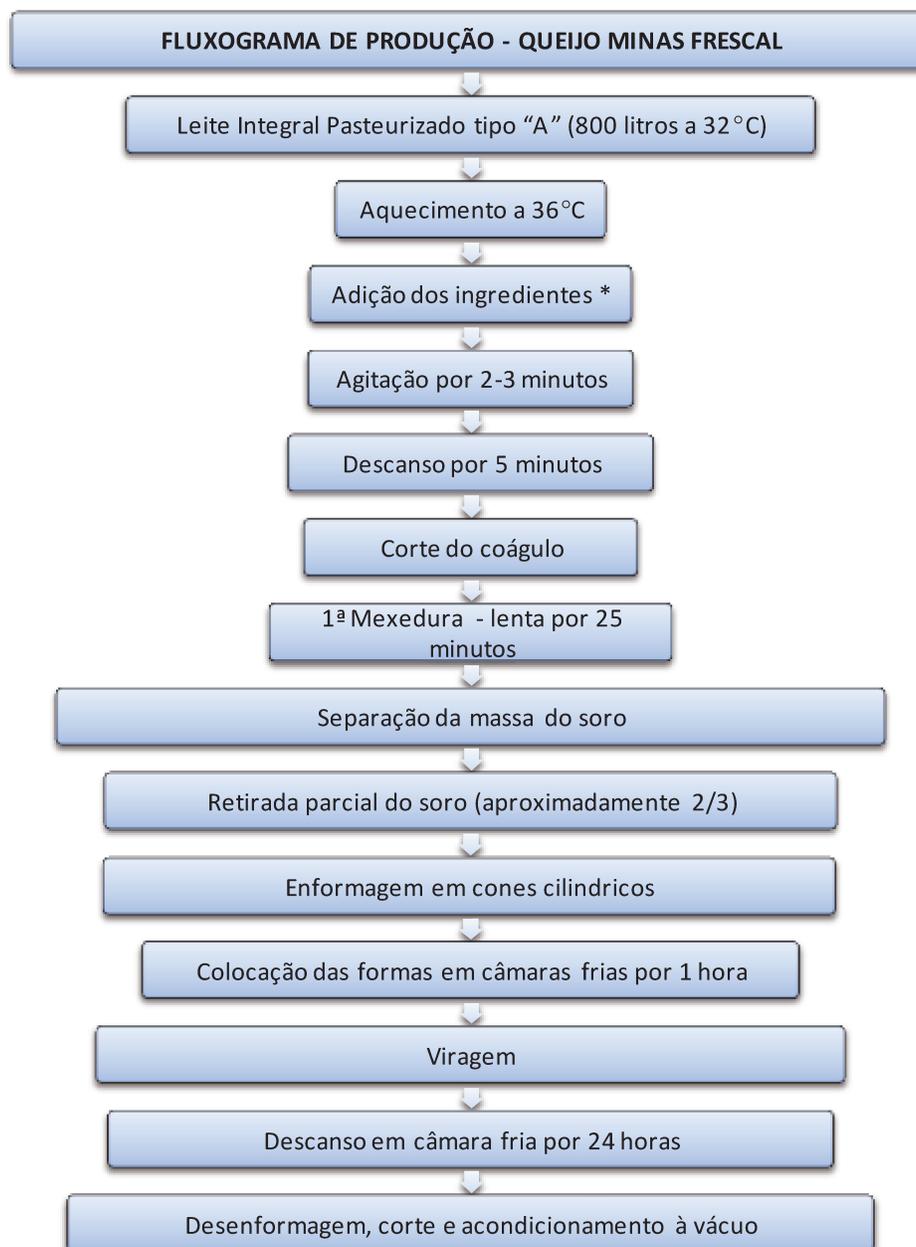
Desta forma, a presente pesquisa teve por objetivo estudar os efeitos da água ozonizada na vida de prateleira do queijo Minas Frescal, avaliando, durante trinta dias, o aumento nas populações de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes totais e termotolerantes, bactérias lácticas, bolores e leveduras e *Staphylococcus sp.*, bem como alteração nos parâmetros físico-químicos de acidez, pH, proteína e gordura do produto.

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Matéria-prima**

Foram utilizadas 39 unidades (peças) de queijo Minas Frescal, com peso individual aproximado de 250 gramas, na realização deste experimento, sendo que as mesmas foram produzidas nos meses de janeiro e março de 2009, em duplicata, a partir de leite pasteurizado, proveniente do Laticínio da Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga (FAYS), sob fiscalização do serviço de inspeção

federal (SIF), local este onde ocorreu todo o processo de fabricação dos queijos, conforme fluxograma apresentado na figura 4.1.



**Figura 4.1** – Fluxograma de produção do Queijo Minas Frescal

\* Ingredientes: 500g de Sorbato de potássio granulado marca Gemacom (conservante); 500 ml Cloreto de cálcio solução a 40% marca River; 500 ml Coagulante enzima quimosina (preparação enzimática à base de protease líquida de *Aspergillus niger* var. awamori - Christian Hansen) - atividade 1:10.000 ou 98 IMCU/ml dissolvido em aproximadamente 500 mL de água sem cloro. 6Kg de sal da marca cisne.

#### 4.2.1.1 Tratamento do queijo Minas Frescal com Água Ozonizada

De cada produção foram reservadas 39 peças de queijo Minas Frescal, divididas em três grupos (GR), para realização dos tratamentos, a saber: grupo 0: imersão em água destilada e filtrada, representando as amostras controle; grupo 1: imersão em água ozonizada a  $2 \text{ mg. mL}^{-1}$  por um período de contato de 1 minuto e, grupo 2: imersão em água ozonizada a  $2 \text{ mg. mL}^{-1}$  por um período de contato de 2 minutos, como pode ser resumido no Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** – Tratamentos e números de amostras de queijo minas frescal utilizados no experimento.

Grupos (GR)	Tratamentos	Números de Amostras
0	Imersão em água destilada e filtrada (Controle)	13
1	Imersão em água ozonizada a $2 \text{ mg. mL}^{-1}$ por um período de contato de 1 minuto	13
2	Imersão em água ozonizada a $2 \text{ mg. mL}^{-1}$ por um período de contato de 2 minutos	13

Na última etapa da produção, após a desenformagem e corte, as 13 peças de queijo de cada grupo foram submersas em seus respectivos tratamentos contidos em tanques de inox, com capacidade de 50 litros e mantidas no mesmo pelos tempos pré-estabelecidos.

Após o tratamento as peças foram içadas e retiradas do tanque, simultaneamente, com auxílio de peneira de aço inox, devidamente higienizadas, permanecendo em descanso por 1 minuto para remoção do excesso de água dos queijos. Cada peça foi embalada a vácuo, em embalagem de polietileno de baixa densidade e devidamente identificadas e armazenadas sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.1.2 Água Ozonizada

Para realizar o tratamento da água com ozônio, foi utilizada a água de abastecimento do estabelecimento que foi ozonizada à concentração de  $2,0 \text{ mgL}^{-1}$

em uma cuba de aço inoxidável com capacidade de 50 litros, por borbulhamento, através de um sistema de recirculação. O gerador de ozônio utilizado foi o modelo PNZ 714<sup>®</sup>, da empresa Panozon, composto de concentrador de oxigênio a 90-95% de pureza, tanque de contato, sistema de injeção com bomba para filtração e sensor de potencial de óxido redução para garantir a transferência eficiente do ozônio gerado para a água, além de um tanque de gaseificação com a função de separar o ozônio produzido na forma de gás, retirando-o e enviando-o, através de tubulação, para um circuito externo de conversão do mesmo em oxigênio.

O controle da concentração de ozônio após cada tratamento foi realizado coletando e submetendo amostras de água do tanque a teste colorimétrico, baseado na reação do ozônio presente na amostra com reagente em pó N-Dietil-P-Fenilenodiamina. Tal reação resulta no desenvolvimento de coloração rósea, de intensidade variável, de acordo com o teor de ozônio residual existente, quantificando a concentração do sanitizante através de leitura comparativa.

#### **4.2.2 Análises laboratoriais**

As análises microbiológicas do queijo minas frescal foram realizadas no Laboratório do Laticínio da Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga (FAYS) e as análises físico-químicas foram realizadas em laboratório credenciado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

As amostras foram analisadas quanto aos parâmetros físico-químicos de gordura, proteína, acidez, densidade e pH nos dias 0, 5, 10, 15, e 30 da produção e quanto aos parâmetros microbiológicos de aeróbios mesófilos, enterobactérias, coliformes totais e termotolerantes, bactérias lácticas, bolores e leveduras e *Staphylococcus* sp., nos dias 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 da produção. Assim, 24 peças foram destinadas ao estudo de estabilidade a partir das análises microbiológicas e, 15 peças, para as análises físico-químicas.

Para as análises microbiológicas, realizadas em triplicata, tomaram-se alíquotas de 25 g de produto para diluição em 225 mL de água peptonada ou solução salina peptonada 0,1%. A partir desta suspensão, foram preparadas diluições decimais seriadas com água salina peptonada e transferidos 1mL para placas de Petri contendo meios de cultura específicos para os microrganismo pesquisados, conforme tabela 4.2.

**Tabela 4.2** – Meios de cultura, temperaturas e período de incubação para os microrganismos estudados no queijo Minas Frescal.

Contagem de microrganismo	Meio de crescimento	Temperatura/período de incubação	Referência
Aeróbios Mesófilos	PCA	35°C /48 horas	(APHA, 1992)
Bactérias Lácteas	Rogosa	30°C /5 dias	(APHA, 1992)
Bolores e Leveduras	PDA	22°C /48 horas	(APHA, 1992)
enterobactérias	VRBA	35°C /48 horas	(APHA, 1992)
<i>Staphylococcus sp</i>	BP	35°C /48 horas	(APHA, 1992)

PCA (ágar platecount - DIFCO®), PDA (ágar potato dextrose - DIFCO®), VRBA (ágar violetred bile dextrose - DIFCO®), BP (ágar Baird Parker - DIFCO®)

Após os respectivos períodos de incubação foram contadas as placas contendo 25 a 250 colônias e aplicados os respectivos fatores de correção para cada diluição (APHA, 1992). Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) .g<sup>-1</sup> de queijo.

Para determinação de coliformes a 35°C e 45°C a técnica utilizada foi a do número mais provável (NMP), através do exame presuntivo em Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com incubação a 36° C por 48 horas e, confirmatórios dos subcultivos em Caldo Verde Brilhante com incubação a 35 °C por 48 horas e Caldo E. coli (EC) com incubação em banho-maria a 45,5±0,5°C por 24 horas, respectivamente. Para a determinação quantitativa foram considerados os tubos positivos com turvação e produção de gás, calculados a partir da tabela do NMP (APHA, 1992).

Como as análises físico-químicas foram realizadas em laboratório credenciado junto ao MAPA, as metodologias seguidas foram oficiais, sendo que para a gordura e proteína (AOAC, 1995) e pH e acidez (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), nos tempos 0, 5, 10, 15 e 30 dias após a produção. As amostras identificadas mantidas sob refrigeração foram encaminhadas ao laboratório, em caixas térmicas contendo gelo, um dia antes dos momentos de análise.

#### **4.2.3 Análises estatísticas**

Na avaliação microbiológica do queijo Minas frescal realizou-se o experimento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 8 , sendo 3 níveis de tempo de exposição ao ozônio (0, 1 e 2 minutos) e 8 diferentes dias após a produção do queijo (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias), com 3 repetições para cada tratamento, totalizando 72 unidades experimentais, no qual cada unidade experimental foi constituída por 1 queijo de 250 g.

Para a realização das análises físico-químicas considerou o experimento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5 , sendo 3 níveis de tempo de exposição ao ozônio ( 0, 1 e 2 minutos) e 5 diferentes dias após a produção do queijo (0, 5, 10, 15 e 30 dias), com 3 repetições para cada tratamento, totalizando 45 unidades experimentais, onde cada unidade experimental foi constituída por 1 queijo de 250 g.

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Para a análise dos efeitos dos tratamentos realizou-se a análise de variância através do procedimento GLM do software estatístico SAS (SAS, 2004), avaliando-se o efeito do tempo de exposição ao ozônio e o efeito do tempo de manufatura do queijo e a interação entre os dois fatores.

O modelo matemático utilizado foi:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + e_{ijk}$$

para  $i = 1$  ou  $2$ ;  $a; j = 1, 2, \dots, 8$  e  $k = 1, 2$  ou  $3$

$y_{ijk}$  é a  $k$ -ésima resposta do  $i$ -ésimo nível do fator A e  $j$ -ésimo nível do fator B

$\mu$  é uma constante (média) comum a todas as observações;

$A_i$  é o efeito do  $i$ -ésimo nível do fator A (tempo de exposição ao ozônio);

$B_j$  é o efeito do  $j$ -ésimo nível do fator B (tempo após manufatura do queijo);

$(AB)_{ij}$  é o efeito da interação entre o  $i$ -ésimo nível do fator A (tempo de exposição ao ozônio) e  $j$ -ésimo nível do fator B (tempo após manufatura do queijo);

$e_{ijk}$  é o erro experimental associado à observação  $y_{ijk}$

### 4.3 Resultados e Discussão

A tabela 4.2 apresenta os logaritmos das contagens de aeróbios mesófilos, bactérias lácticas e bolores e leveduras, em função dos tempos de armazenagens do queijo Minas Frescal. O logaritmo das contagens foi calculado com a intenção de corrigir a normalidade dos resíduos e manter a homogeneidade das variâncias.

Não houve presença de enterobactérias, coliformes totais e termotolerantes e *Staphylococcus sp.* nas amostras de queijo minas frescal analisadas durante os experimentos. Provavelmente a ausência destes microrganismos no queijo minas frescal possa ser justificada pela boa higiene do local onde foi realizado o experimento. Diferentemente disto, trabalhos como o de Oliveira *et al.* (1998) confirmaram a presença de coliformes a 35°C e a 45°C acima do permitido pela legislação, respectivamente, em 46,9% e 9,4% das amostras de queijo minas frescal elaboradas por seis fábricas de laticínios em São Paulo. Pereira *et al.* (1999) também observaram que 90% das amostras do Minas Frescal, comercializadas em Belo Horizonte, apresentaram coliformes fecais acima dos limites permitidos.

Pinto *et al.* (2004) analisaram quatro marcas diferentes de queijo Minas Frescal, na região de Feira de Santana, Bahia e observaram que 42% e 100% das amostras estavam com os níveis de coliformes fecais e totais, respectivamente, acima do permitido pela legislação. No trabalho de Lisita (2005) encontrou-se uma população de  $1,1 \times 10^8$  NMP/g de coliformes fecais e  $< 10,0$  UFC/g de *Staphylococcus*coagulase positiva. Rocha *et al.* (2006) verificaram a evolução da contaminação microbiana de sete marcas de queijo Minas Frescal, durante sua vida de prateleira, em São Paulo capital e detectaram que seis marcas apresentaram índice de contaminação de *Staphylococcus* spp., coliformes, *E. coli* e bactérias lácticas acima do recomendável. Além disso, os autores observaram que as populações de coliformes e *E. coli* de queijos Minas preparados com leite pasteurizado aumentaram 2,5 ciclos log, enquanto nos queijos fabricados com leite *in natura*, o aumento foi de 4,5 ciclos log e 5,0 ciclos log, respectivamente.

**Tabela 4.3** – Médias (Log UFC/g) das contagens de microrganismos presentes no queijo minas frescal durante tratamento com água ozonizada a 2,0mg L<sup>-1</sup>, em função do tempo de estocagem .

variável	tempo de prateleira										Probabilidades		
	ozônio	0	1	5	10	15	20	25	30	erro padrão	ozônio	dia de prateleira	interação
log mesófilos aeróbios	0	2,36	2,58	3,37	3,93	4,22	4,46	4,79	5,03	0,194	<,0001	<,0001	<,0001
	1	1,60	1,78	2,04	2,46	2,82	2,86	3,03	3,12	0,115			
	2	0,82	1,12	1,73	2,32	2,57	2,74	2,92	3,00	0,172			
	erro padrão	0,26	0,21	0,25	0,26	0,26	0,28	0,3	0,33				
log bactérias lácticas	0	1,90	2,05	2,39	2,66	2,85	2,99	3,06	3,23	0,094	<,0001	<,0001	0,0014
	1	0,82	1,00	1,22	1,52	1,60	1,92	2,07	2,29	0,114			
	2	0,00	0,00	0,82	1,43	1,48	1,70	1,85	1,94	0,16			
	erro padrão	0,296	0,297	0,275	0,201	0,218	0,2	0,187	0,193				
log bolores e leveduras	0	2,34	2,12	2,40	2,86	3,02	3,38	3,61	3,93	0,137	<,0001	<,0001	0,0103
	1	1,00	1,30	1,43	1,73	1,80	1,90	2,12	2,19	0,102			
	2	0,00	0,52	1,12	1,43	1,67	1,85	2,00	2,21	0,16			
	erro padrão	0,344	0,278	0,192	0,228	0,217	0,251	0,258	0,288				

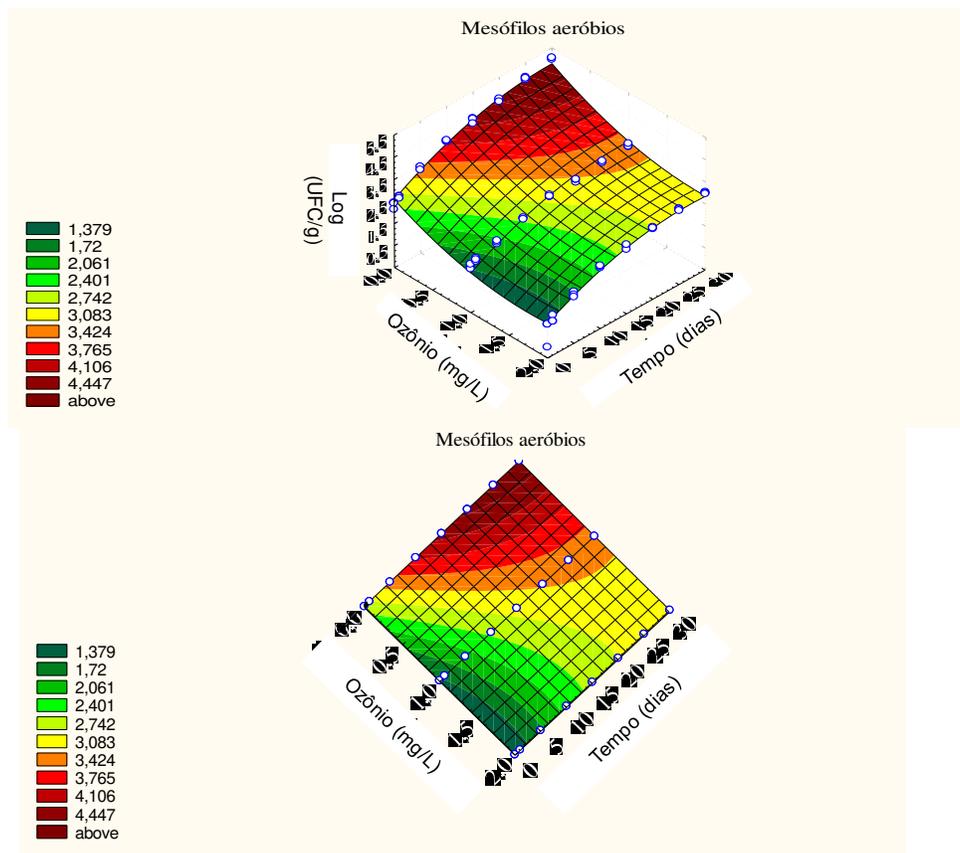
O grupo controle (GR0), no qual o queijo foi apenas banhado em água destilada e filtrada apresentou, de acordo com a tabela 4.3, contagens das populações médias iniciais de aeróbios mesófilos, bactérias lácticas e bolores e leveduras, de  $2,27 \times 10^2$ ,  $8,00 \times 10^1$  e  $2,17 \times 10^2 \text{UFC.g}^{-1}$ , respectivamente, enquanto as populações iniciais destes microrganismos, imediatamente após (tempo 0) o tratamento com água ozonizada na concentração de  $2,0 \text{mg.L}^{-1}$ , foram de  $6,67 \times 10^1$ ,  $0,00$  e  $0,00 \text{UFC.g}^{-1}$ , para 2 min de aplicação do sanitizante e  $4,00 \times 10^1$ ,  $6,67 \times 10^0$  e  $1,0 \times 10^0 \text{UFC.g}^{-1}$ , para 1 min de aplicação do sanitizante, respectivamente.

Desta forma, pode-se observar uma redução decimal, imediatamente após 2 minutos de banho com água ozonizada na concentração de  $2,0 \text{mg.L}^{-1}$  para microrganismos aeróbios mesófilos, bactérias lácticas e bolores e leveduras de 1,53, 1,90 e 2,34 ciclos logaritmos, respectivamente.

É interessante verificar na tabela 4.3 que o ganho de vida de prateleira e, conseqüente, ganho de qualidade do queijo minas frescal em relação ao parâmetro microbiológico é expressivo, uma vez que as populações iniciais de aeróbios mesófilos e bactérias lácticas nos queijos tratados com  $2,0 \text{mg.L}^{-1}$  de água ozonizada, durante 1 minuto, superaram as cargas microbianas das amostras controle a partir dos dias 10 e 25, respectivamente. Para bolores e leveduras a contagem no dia 30 foi de  $1,53 \times 10^2 \text{UFC.g}^{-1}$ , não superando a contagem inicial nas amostras do grupo 0.

O acréscimo na carga microbiana de microrganismos aeróbios mesófilos, após trinta dias de estocagem, para o grupo controle, foi de 2,68 ciclos logarítmicos, coincidindo com resultados obtidos por Sangaletti (2007) que observou que a contagem de microrganismos mesófilos totais no queijo minas frescal de seis marcas com registro do serviço de inspeção federal na cidade de Piracicaba/SP durante o período de 30 dias armazenados a  $4^\circ\text{C}$ , aumentou, em média,  $2,57 \log \text{UFC/g}$ , a cada período de amostragem. Segundo o autor o grande aumento desta população no decorrer de 30 dias sob refrigeração mostra a possibilidade da deterioração do produto, alterando suas propriedades físico-químicas ocasionando a redução de sua vida de prateleira.

A figura 4.2 apresenta as superfícies de respostas geradas a partir dos tratamentos com água ozonizada no queijo Minas Frescal, bem como as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos no decorrer do tempo de estocagem do produto.



**Figura 4.2** – Superfície de resposta para o logarítmico da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos em função do tratamento e dos dias de vida de prateleira.

De acordo com a figura 4.2 observa-se que houve interação entre vida de prateleira e tempo de aplicação do ozônio para o logaritmo do número de microrganismos aeróbio mesófilos. Nos dias 0 e 1 houve efeito linear de ozônio ( $P < 0,05$ ), ou seja, quanto maior o tempo de exposição ao ozônio aplicado no queijo, menor o logarítmico da contagem da bactéria.

O aumento da carga microbiana de aeróbios mesófilos, para as amostras de queijo minas frescal tratadas com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de água ozonizada, por 1 e 2

minutos, foi de 1,52 e 2,18 ciclos logaritmos, respectivamente, no final de trinta dias. Conforme Silva *et al.* (2003) e Jay (1994) a presença dos mesófilos totais vem sendo utilizada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, pois indica o tempo útil de conservação e a quantidade de microrganismos patogênicos presentes.

Observa-se, ainda, na figura 4.2 que a ação da água ozonizada no queijo minas frescal apresentou uma maior efetividade imediatamente após a aplicação do sanitizante, em relação às reduções observadas a partir do dia 15.

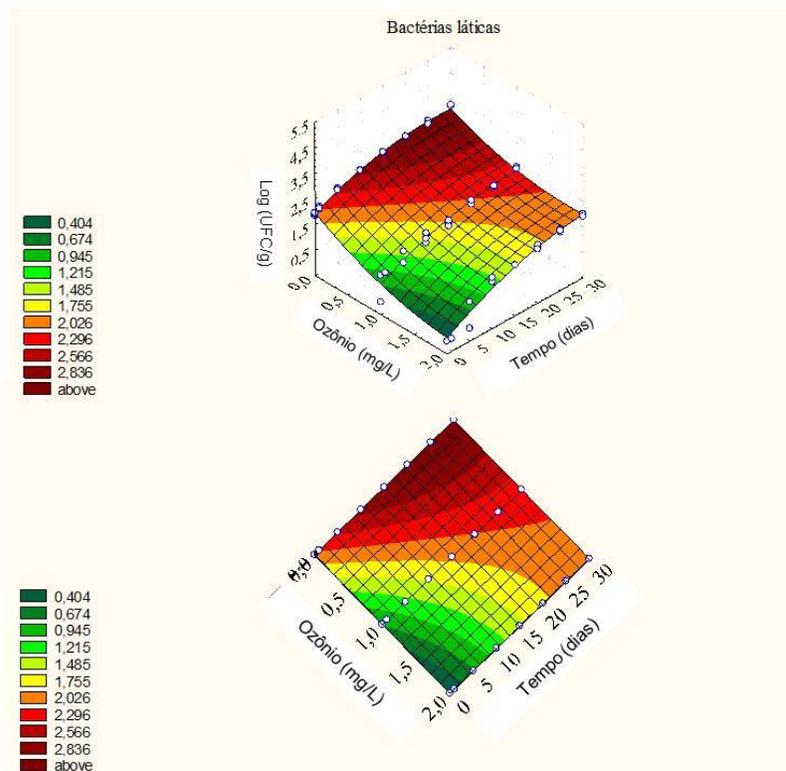
A tabela 4.4 apresenta as equações que relacionam a influência dos dias de estocagem sobre os tratamentos realizados, definindo a data de maior contagem de aeróbios mesófilos e a contagem máxima estimada. Houve efeito quadrático para as amostras de queijo minas frescal tratadas com água ozonizada na concentração de 2,0mg.L<sup>-1</sup> pelo período de 1 minuto e efeito cúbico (P<0,05) para as amostras relativas tratamentos controle e que ficaram sobre imersão no sanitizante por 2 minutos.

As amostras apresentaram uma considerável dispersão através das equações, verificando-se que o R<sup>2</sup> variou de 0,94 a 0,99, conforme tabela 4.4. A maior contagem que foi constatada, de maneira calculada e estimada, para a contagem de aeróbios mesófilos ocorreu no dia 29,89, ou seja, no último dia de estocagem, sendo que a maior população do microrganismo foi de 1,32x10<sup>3</sup> UFC.g<sup>-1</sup>.

**Tabela 4.4** – Equações relativas aos efeitos do tempo de estocagem sobre os tratamentos realizados no queijo minas frescal em função do logaritmo da contagem de aeróbios mesófilos.

Gr.	Equações	R <sup>2</sup>	Tempo estimado com máxima contagem (dias)	Contagem máxima estimada
0	$y = 2,355597295 + 0,238367026 \text{ dia} - 0,009919476 \text{ dia}^2 + 0,000166014 \text{ dia}^3$	0,99		
1	$y = 1,637414827 + 0,097204511 \text{ dia} - 0,001626209 \text{ dia}^2$	0,98	29,89	3,09
2	$y = 0,7955687030 + 0,2310545075 \text{ dia} - 0,0095031897 \text{ dia}^2 + 0,0001426223 \text{ dia}^3$	0,94		

A figura 4.3 apresenta as superfícies de respostas geradas a partir dos tratamentos com água ozonizada no queijo minas frescal em relação aos tempos de estocagem, bem como os logaritmos das contagens de bactérias lácticas nos tempos ótimos de aplicação do tratamento.



**Figura 4.3** – Superfície de resposta para o logaritmo da contagem de bactérias lácticas em função do tratamento e da vida de prateleira

De acordo com a figura 4.3 observou-se que houve interação entre os tempos de tratamento de imersão dos queijos minas frescal na água ozonizada e os dias de estocagem do produto em ambiente refrigerado. Para os dias 0 e 1 verifica-se que houve efeito linear ( $P < 0,05$ ).

Nos dias 5, 10, 15, 20, 25 e 30 houve efeito quadrático ( $P < 0,05$ ). A quantidade de bactérias lácticas diminuiu conforme aumentou o tempo de aplicação de ozônio, até um ponto máximo (tempo ótimo de ozônio). Observa-se que a curva tendeu a uma estabilização, uma vez que o ozônio foi aplicado apenas no tempo 0. As menores contagens ocorreram nos primeiros dias de estocagem, sendo que as

amostras chegaram ao último dia do experimento, com populações, para os queijos tratados com 2,0mg.L<sup>-1</sup> de água ozonizada, de 2,21 log de bactérias lácticas.

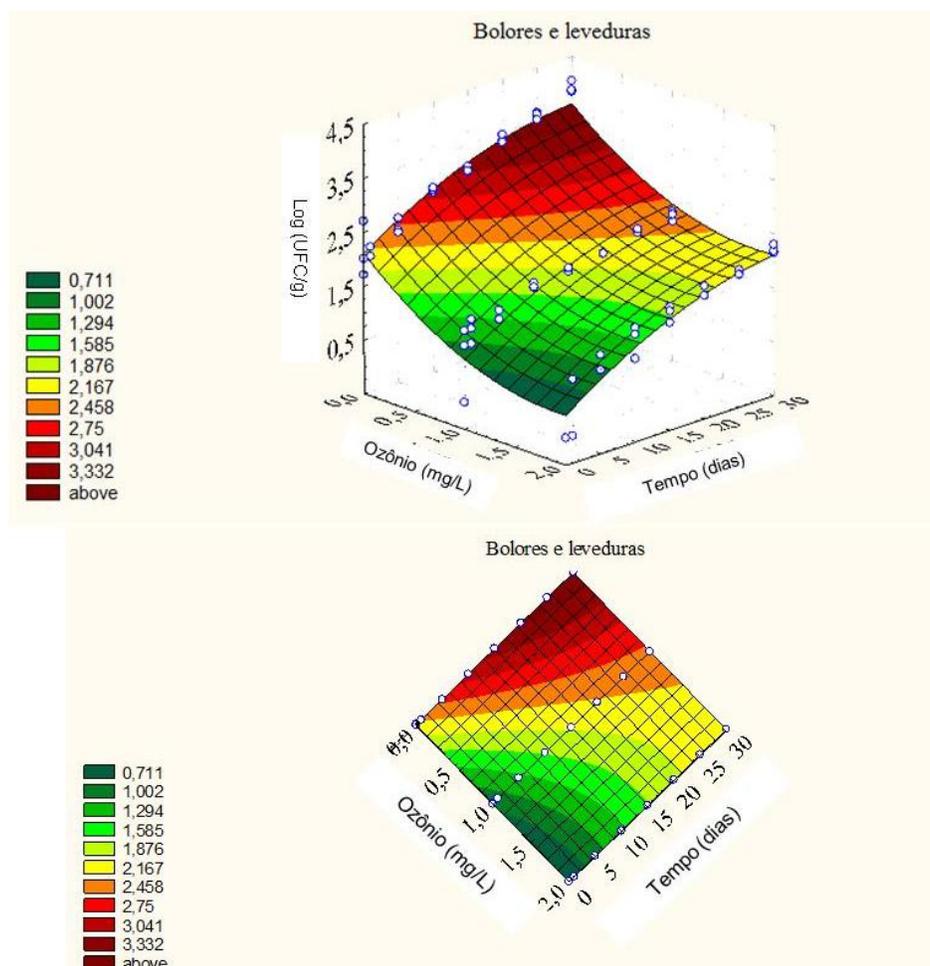
A tabela 4.4 apresenta as equações que relacionam a influência dos dias de estocagem sobre os tratamentos realizados, definindo a data de maior contagem de bactérias lácticas e a contagem máxima estimada. Observou-se efeito quadrático para as amostras controle, efeito linear para as amostras tratadas com 2,0mg.L<sup>-1</sup> de água ozonizada pelo período de 1 minuto e efeito cúbico para as amostras que foram tratadas pelo sanitizante por período de 2 minutos. Os resultados mostram que a maior contagem para as bactérias lácticas foi de 1,7x10<sup>3</sup>UFC.g<sup>-1</sup> e exatamente para o último dia de análise, 28,78, e nas amostras controle.

Resultados diferentes foram observados por Manolopoulou *et al.* (2003) que observou no queijo, a evolução de bactérias lácticas de 3,76 log UFC/g a 9,97 log UFC/g durante um período de 16 dias. Rocha *et al.* (2006) avaliaram a evolução das bactérias lácticas encontradas em queijo minas frescal de sete diferentes marcas, durante 21 dias, em São Paulo capital, e verificaram que seis marcas apresentaram população média final de 8,0 log UFG/g não apresentando crescimento com o passar dos dias.

**Tabela 4.5** – Equações relativas aos efeitos dos dias em estoque sobre os tratamentos realizados no queijo minas frescal em função do logarítmico da contagem de bactérias lácticas.

Gr.	Equações	R <sup>2</sup>	Tempo estimado com máxima contagem (dias)	Contagem máxima estimada
0	$y = 1,970205636 + 0,077549478 \text{ dia} - 0,001347241 \text{ dia}^2$	0,98	28,78	3,09
1	$y = 0,9051002283 + 0,0478915873 \text{ dia}$	0,83		
2	$y = -0,0988198039 + 0,2110411880 \text{ dia} - 0,0084930802 \text{ dia}^2 + 0,0001244736 \text{ dia}^3$	0,93		

A figura 4.4 apresenta as superfícies de respostas geradas a partir dos tratamentos com água ozonizada no queijo minas frescal em relação aos tempos de estocagem, bem como as contagens dos logaritmos de bolores e leveduras.



**Figura 4.4** – Superfície de resposta para o logarítmico da contagem de bolores e leveduras em função do tratamento e dos dias de vida de prateleira.

Observou-se maiores reduções no dia 0 para a concentração de  $2,0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de água ozonizada em relação aos demais dias. A curva tendeu a estabilização no crescimento de bolores e leveduras a partir do dia 5, principalmente, pelo fato de não haver ozônio residual e o crescimento comportou-se de maneira natural, alcançando, no dia 30, para as amostras controles  $3,33\text{ log}$  do microrganismo.

Verificou-se que as amostras tratadas com 2,0mg.L<sup>-1</sup> de água ozonizada atingiram as populações da amostra controle no tempo 0, apenas a partir do dia 25, demonstrando uma excelente eficiência na aplicação do sanitizante

A tabela 4.6 mostra as equações que relacionam a influência dos dias de estocagem sobre os tratamentos realizados, definindo a data de maior contagem de bolores e leveduras e a contagem máxima estimada.

**Tabela 4.6** – Equações relativas aos efeitos dos dias em estoque sobre os tratamentos realizados no queijo minas frescal em função do logarítmico da contagem de bolores e leveduras.

Gr.	Equações	R <sup>2</sup>	Dia estimado com máxima contagem	Contagem máxima estimada
0	$y = 2,123883928 + 0,060638357 \text{ dia}$	0,93		
1	$y = 1,025157407 + 0,074229369 \text{ dia} - 0,001331522 \text{ dia}^2$	0,74	27,87	2,06
2	$y = 0,0858057417 + 0,2314029941 \text{ dia} - 0,0110860518 \text{ dia}^2 + 0,0001922629 \text{ dia}^3$	0,92		

Para bolores e Leveduras verificou-se efeito linear nas amostras controle (grupo 0), efeito quadrático nas amostras do grupo 1 e efeito cúbico nas amostras do grupo 2. A máxima contagem estimada foi de 1,15X10<sup>2</sup>UFC.g<sup>-1</sup> e apresenta-se, também, próximo ao último dia do experimento (dia 27,87). Porém a máxima contagem observada foi de 8,43X10<sup>2</sup>UFC.g<sup>-1</sup> no dia 30 para as análises realizadas no grupo controle.

A tabela 4.7 mostra os efeitos do tratamento com água ozonizada nos parâmetros físico-químico estudados neste trabalho ao longo da vida de prateleira do queijo minas frescal.

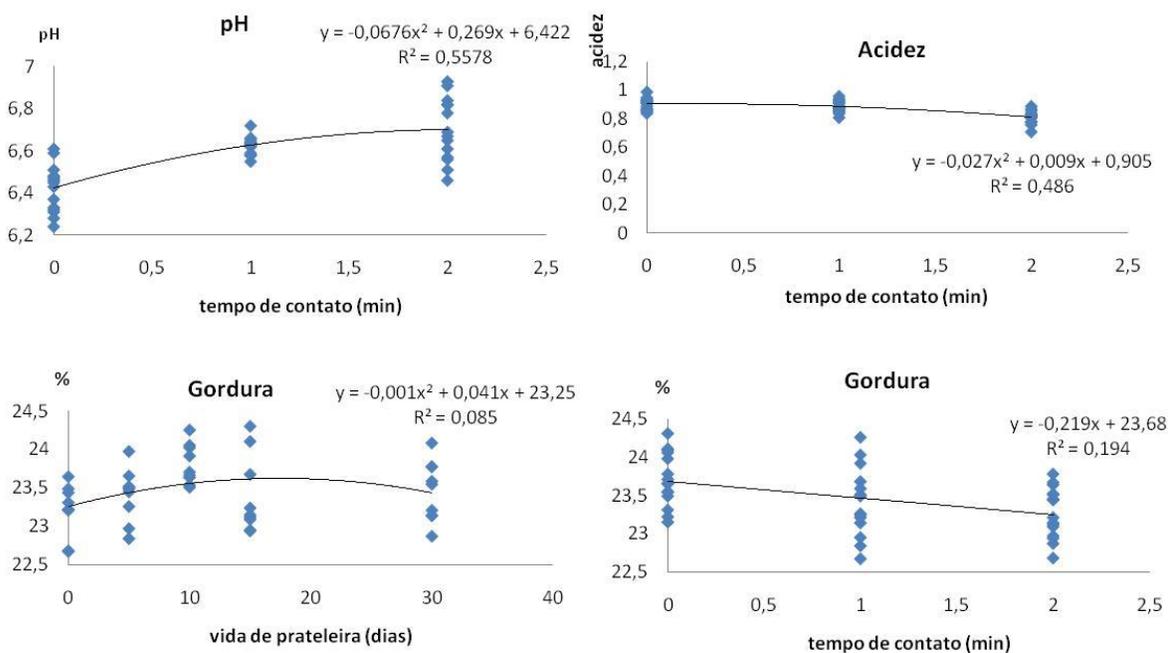
**Tabela 4.7** – Efeitos dos tratamentos com água ozonizada, nos parâmetros físico-químicos no queijo minas frescal, em função do tempo de estocagem .

Acidez (°D)						Probabilidades			
Grupos	0	5	10	15	30	erro padrão	Ozônio	vida de prateleira	interação
0	0,95	0,89	0,91	0,87	0,91	0,011			
1	0,90	0,91	0,88	0,85	0,89	0,010	<,0001	0,3021	0,2315
2	0,77	0,80	0,86	0,81	0,82	0,012			
erro padrão	0,029	0,018	0,013	0,015	0,020				
Proteína (%)						Probabilidades			
Grupos	0	5	10	15	30	erro padrão	Ozônio	dia de prateleira	interação
0	13,01	13,29	12,91	13,10	13,44	0,068			
1	13,09	12,91	13,38	13,42	13,48	0,114	0,5991	0,0948	0,4024
2	12,68	13,29	13,17	13,32	13,23	0,097			
erro padrão	0,121	0,100	0,127	0,106	0,118				
Gordura (%)						Probabilidades			
Grupos	0	5	10	15	30	erro padrão	Ozônio	dia de prateleira	interação
0	23,39	23,71	23,77	23,86	23,81	0,090			
1	23,08	23,20	24,07	23,29	23,31	0,123	0,0037	0,0121	0,4043
2	23,11	23,31	23,61	23,05	23,26	0,085			
erro padrão	0,127	0,115	0,087	0,170	0,131				
pH						Probabilidades			
Grupos	0	5	10	15	30	erro padrão	Ozônio	dia de prateleira	interação
0	6,45	6,36	6,48	6,42	6,41	0,028			
1	6,60	6,60	6,64	6,62	6,67	0,011	<,0001	0,0670	0,0871
2	6,54	6,75	6,83	6,59	6,81	0,040			
erro padrão	0,035	0,065	0,057	0,038	0,068				

A acidez, pH e gorduras apresentaram variações significativas ( $P < 0,05$ ), para o tratamento com ozônio na concentração de  $2,0 \text{mg.L}^{-1}$ , porém a porcentagem de proteína não foi alterada pelos tratamentos realizados. Em função dos dias de estocagem do queijo minas frescal tratados com água ozonizada na concentração de  $2,0 \text{mg.L}^{-1}$ , durante os trinta dias de avaliação da vida de prateleira do produto, observou-se variações significativas ( $P < 0,05$ ) apenas para o parâmetro gordura.

Para os queijos imersos em água filtrada e destilada, grupo 0, entre os dias 0 e 30, observou-se variações sem diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) de 0,95 a 0,91<sup>o</sup>D para o parâmetro acidez. Para o parâmetro gordura, verificou-se variações nas casas decimais, onde o componente variou de 23,08% a 24,07%, apresentando, diferenças significativas entre os dias de estocagem para  $P < 0,05$ .

A figura 4.5 apresenta os parâmetros físico-químicos de pH, acidez e gordura no queijo minas frescal em função da imersão do produto em água ozonizada na concentração de  $2,0 \text{mg.L}^{-1}$ , entre 0 e 2 minutos.



**Figura 4.5** – Representação gráfica dos parâmetros físico químicos do queijo minas frescal em relação ao tratamento com água ozonizada.

Os resultados apresentados na figura 4.5 demonstram que a acidez variou conforme equação quadrática. O valor estimado para obtenção de maior acidez (0,90), de acordo com a equação, foi de 0,16 minutos de ozônio (9,6 segundos).

A porcentagem máxima estimada de gordura (23,62%) foi encontrada no dia 17. A equação mostra que a porcentagem de gordura no queijo diminuiu conforme aumentou o tempo de exposição do queijo ao ozônio. Esta queda na quantidade de gordura pode ser definida em virtude da quantidade de dias de estocagem e não em função da aplicação do sanitizante, uma vez que, ao observar a variação linear do parâmetro gordura, observou-se, de acordo com o  $R^2$  que o ozônio participou com 19,4% do resultado.

Com relação ao pH, os queijos analisados seguiram equação quadrática estabelecida na figura 4.5. Os resultados demonstram que o aumento do tempo de exposição ao sanitizante ocasionou um incremento no pH do produto. O pH máximo estimado (6,68) pela equação foi de 1,98 minutos de exposição ao ozônio.

Verificou-se de acordo com a tabela 4.6 uma variação do pH de 6,45 no tempo 0 para 6,41 no tempo 30 para as amostras controles, definindo uma redução de 0,03. Estes dados diferenciam dos encontrados por Buriti *et al.* (2005) que pesquisaram o efeito do crescimento de bactérias lácticas sobre as características físico-químicas e sensoriais do queijo minas frescal durante 21 dias, em câmara fria a 5°C e observaram a redução do pH de forma significativa, variando o pH de 6,16 a 5,38 (redução de 0,78) mesmo quando as contagens das bactérias permaneceram constantes de 8,45 a 8,93 log UFG/g com o passar dos dias.

Sangaletti (2007) encontrou resultados diferentes deste trabalho ao verificar uma redução no pH de 0,81 entre o 1° dia e o 30° dia de estocagem de queijo minas frescal.

#### 4.4 Conclusões

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que a utilização da água ozonizada na concentração de  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , manteve as condições microbiológicas e físico química do queijo minas frescal dentro dos padrões legais vigentes e permitiu um ganho na vida de prateleira do produto em relação as amostras controles superior a 15 dias. :

#### 4.5 Agradecimentos

Agradeço à Fazenda da Aeronáutica pela possibilidade de utilização das instalações do laticínio e pela doação dos utensílios, ingredientes e produtos utilizados no processo de fabricação do queijo minas frescal.

#### 4.6 Referências Bibliográficas

ABIQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO.

**Informações sobre tipos de queijo no Brasil.** Disponível em: <[www.abiq.com.br](http://www.abiq.com.br)>. Acesso em: 15 mai. 2011.

APHA, **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 18 ed. American Public Health Association, Washington, DC, 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. 1995. **Official Methods of Analysis.** 16.ed. AOAC, Washington, DC, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA.** Brasília: SDA, 1952. p. 124.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. Portaria nº 146. **Diário Oficial da União** nº 172, Brasília, 11 mar. 1996.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo minas frescal. Portaria nº352. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 set.1997. Seção I, p.13-68.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre

padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União** nº 172, Brasília, 02 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº4 de 1 de março de 2004. **Diário Oficial da União, Brasília**, 5 mar. 2004. Seção I, p.5.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, n.12, p.1279-1288, dec., 2005.

CAMPOS, D.C. **Queijo**: breve histórico e principais características. Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microbiologia Agrícola. Piracicaba: ESALQ; NAPMA, 2001. 59p. (NAPMA, n.11).

CARVALHO, J.D.G. **Avaliação da Qualidade de Queijos Tipo Minas Frescal Elaborados por Diferentes Processos Tecnológicos e Comercializados em Campinas-SP**. 2003. 107f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS (EPAMIG). **Os queijos na Fazenda**. Rio de Janeiro: Globo, 1987. 219p. (Coleção do Agricultor-Laticínios).

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo: IMESP, 3. ed., 1985.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza: Editora Acribia, 1994. 492p.

KHADRE, M.A., YOUSEF, A.E. Decontamination of a multilaminated aseptic food packaging material and stainless steel by ozone. **Journal of Food Safety**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2001.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E., CHISM. G.W. Use of ozone to inactivate microorganisms on Lettuce. **Journal of Food Safety**, v.19, p.17-37, 1999A.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E., DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62, n.9, p.1071-1087, 1999B.

LISITA, M.O. **Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo Minas frescal em uma indústria de laticínios**. Piracicaba, SP. 2005. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MANOLOPOULOU, E.; SARANTINOPOULOS, P.; ZOIDOU, E.; AKTYPIS, A.; MOSCHOPOULOU, E.; KANDARAKIS, I.G.; ANIFANTAKIS, E.M. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, apr., 2003.

OLIVEIRA, C. A. F.; MORENO, J. F. G.; MESTIERI, L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos minas frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do Estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v. 12, p.31-35, 1998.

PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo-de-minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 5, 1999.

PINTO, C. P.; MASCARENHAS, M. O.; FIGUEIREDO, H. M.; TESHIMA, E. Queijo Minas Frescal: avaliação da qualidade microbiológica. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 21., Juiz de Fora. **Anais...**, v. 59, n. 339, 2004.

ROCHA, J.S.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas-frescal. **Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

SANGALETTI, N. **Estudo da vida útil do queijo Minas frescal disponível no mercado**. 2007. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SAS INSTITUTE 9.1 User's guide. Cary: SAS Institute Inc., 2004. 1040p.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology** v. 81, p. 241–248, 2003.

## CAPÍTULO V. EFEITOS DO GÁS OZÔNIO NA SANITIZAÇÃO DE CÂMARAS FRIGORÍFICAS

### Resumo

A contaminação dos alimentos pelo ar é um problema que está preocupando, atualmente, as fábricas de alimentos. A indústria está pesquisando sanitizantes que sejam efetivos contra patógenos e seguros para o uso. O ozônio pode ser utilizado na forma gasosa em câmaras frigoríficas, silos e depósitos de alimentos. A aplicação direta de gás ozônio em depósitos mantém o ambiente limpo e esterilizado, mesmo quando há altos índices de calor e umidade, o que assegura maior tempo de armazenamento e vida útil dos alimentos. O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito do gás ozônio sobre as populações de microrganismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras na qualidade microbiológica do ar e superfícies no interior de câmaras frigoríficas de estocagem de queijo minas frescal. O experimento foi realizado, comparando-se a qualidade microbiológica do ar e de partes componentes de uma câmara fria de área total de 27,6 m<sup>2</sup>, com e sem tratamento com ozônio, utilizada durante a fabricação e estocagem de queijo minas frescal. As coletas foram realizadas diariamente, durante 120 dias, para as análises do ar ambiente e a cada 2 dias durante 60 dias com a câmara sem ozônio e a cada 2 dias durante 60 dias com o equipamento gerador de ozônio ligado e proporcionando uma concentração de 0,03 mg.L<sup>-1</sup> de ar. Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Não foram constatadas diferenças significativas nos resultados obtidos entre os diferentes pontos amostrados do ar ambiente nas duas condições de ensaios. Observou-se uma redução de microrganismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras de 0,81 e 1,01 ciclos logaritmos, respectivamente, no ar ambiente da câmara fria, após a aplicação do gás ozônio na concentração de 0,03mg.L<sup>-1</sup>. A aplicação do sanitizante proporcionou reduções decimais, estatisticamente significativas pelo teste de Tukey – Kramer (P<0,05), para as contagens de aeróbios mesófilos na superfície da parede direita, parede esquerda, parede do fundo e porta da câmara de 0,43; 0,40; 0,44 e 0,27 ciclos logaritmos, respectivamente. A estante apresentou uma redução de 0,08 ciclos logaritmos em relação à contagem inicial de aeróbios mesófilos, não sendo, desta forma, considerada uma diferença significativa pelo Tukey – Kramer (P<0,05).

**Palavras-chave:** câmara fria, gás ozônio, sanitização

## CHAPTER V. EFFECTS OF OZONE GAS IN COLD CHAMBERS SANITIZATION

### Abstract

Contamination of food by air is a problem that is currently worrying food factories. The industry is searching sanitizers that are effective against pathogens and safe to use. Ozone can be used in gaseous form in cold chambers, food warehouses and silos. The direct application of ozone gas in tanks keeps the ambience clean and sterile, even when there are high rates of heat and moisture, which ensures longer storage and shelf life of foods. The purpose of this study was to evaluate the effect of ozone gas on populations of mesophilic aerobic microorganisms, molds and yeasts in the microbiological quality of the air and surfaces inside cold chambers for Minas frescal cheese maturation. The experiment was conducted comparing the microbiological quality of the air and parts of a cold chamber with total area of 27.6m<sup>2</sup>, with and without ozone treatment used in the Minas frescal cheese maturation and storage. Samples were collected daily during 120 days for ambient air analysis and every two days during 60 days without ozone and every 2 days during 60 days with the ozone generator on, providing an air concentration of 0.03 mg.L<sup>-1</sup>. The data were evaluated for normality of residuals and homogeneity of variances. There were no significant differences in results between the different points of the sampled ambient air conditions in both trials. There was a reduction of mesophilic aerobic, yeast and mold log-cycles of 0.81 and 1.01, respectively, in the cold chamber air after the application of ozone gas with 0.03 mg.L<sup>-1</sup> concentration. The sanitizer application resulted in statistically significant (Tukey – Kramer, P <0.05) decimal reductions for aerobic mesophilic counts on the surface of the chamber door, right, left and back walls of 0.27, 0.43, 0, 40 and 0.44 log-cycles, respectively. The shelf presented a reduction of 0.08 log-cycle in relation to the initial count of aerobic mesophilic and is not, therefore, considered a significant difference by Tukey - Kramer (P <0.05).

**Keywords:** cold chamber, ozone gas, sanitation

## 5.1 Introdução

A obtenção de um produto seguro não termina nas linhas de produção e, sim, complementa-se no seu armazenamento, onde requer um ambiente higiênico, seguro e saudável. A higiene, limpeza e sanitização, das câmaras frigoríficas é negligenciada, atualmente, por grande parte das indústrias de alimentos.

Os microrganismos presentes no ambiente de processamento e de estocagem de alimentos podem levar à contaminação do produto acabado. As fontes de contaminação do meio ambiente incluem alimentos, manipuladores, animais, insetos, além de utensílios e componentes estruturais como portas, paredes e teto de armazéns e câmaras frigoríficas. O ar do ambiente, as embalagens primárias, as mãos dos funcionários, bem como os equipamentos, constituem pontos importantes que devem ser considerados nas Boas Práticas de Fabricação de forma a não representarem risco de contaminação para o produto.

A contaminação dos alimentos pelo ar é um problema em indústrias de alimentos. Segundo Othmane *et al.* (2011) a qualidade do ar no interior das plantas de processamento é controlada, diariamente, por muitas indústrias alimentícias, principalmente, em programas de controle de qualidade. O autor recomenda que o sistema de ventilação das indústrias sejam higienizados regularmente, para evitar o acúmulo de pó, produto ou condensado que podem fornecer um foco para o crescimento microbiano.

Segundo Frazier e Westhff (1993) as baixas temperaturas são utilizadas para retardar reações químicas e a atividade das enzimas dos alimentos, diminuir ou paralisar a multiplicação e a atividade dos microrganismos existentes e não para eliminá-los. Os alimentos derivados do leite, podem ser mantidos em temperaturas de refrigeração (5 a 7,2 °C) durante tempo limitado sem que sua natureza original seja modificada de forma importante. O queijo Minas frescal deve ser embalado e ficar acondicionado em temperaturas não superiores a 8°C,

conforme Resolução RDC nº145/96 do MAPA (BRASIL 1996), procedimento importante para preservar a vida de prateleira do alimento.

A qualidade do ar das câmaras frias onde os queijos são armazenados até o seu transporte para os locais de comercialização é de suma importância, uma vez ser comum encontrar a presença de microrganismos patogênicos e deterioradores que, com certeza podem prejudicar a integridade física de consumidores, bem como ocasionar prejuízos consideráveis para as indústrias, em virtude da diminuição da qualidade do produto.

Para Veiga (2003) o ozônio pode ser utilizado na forma gasosa em câmaras frigoríficas, silos e depósitos de alimentos, com a finalidade de proteger e conservar produtos acabados e matérias primas. A aplicação direta de gás ozônio em depósitos mantém o ambiente limpo e esterilizado, mesmo quando há altos índices de calor e umidade, o que assegura maior tempo de armazenamento e vida útil aos alimentos.

Salvador *et al.* (2006) estocaram caqui sob 15°C por 30 dias a uma concentração de 0,15 ppm de ozônio e 90% de umidade relativa. Foi observado que no armazenamento sob ozônio os caquis não apresentaram alteração de cor, pH e sólidos solúveis totais, além da sua firmeza ser mantida por mais tempo que o limite comercial, aumentando sua vida de prateleira.

O ozônio é um forte agente microbiano com alta reatividade e decomposição espontânea em produtos não tóxicos. Pode ser aplicado em alimentos nas formas líquida e gasosa. O ozônio molecular ou seus produtos de decomposição inativam microrganismos rapidamente reagindo com elementos vitais da célula, como enzimas intracelulares, ácidos nucléicos e membranas celulares. O ozônio é adequado para descontaminar produtos alimentícios, equipamentos, ambientes, superfícies que entram em contato com alimentos, tratar água e efluentes, etc (KIM *et al.*, 1999; KHADRE *et al.*, 2001AB).

Desta forma, objetivou-se neste experimento avaliar o efeito do gás ozônio sobre as populações de microrganismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras na qualidade microbiológica do ar e superfícies no interior de câmaras frigoríficas de armazenamento de queijo minas frescal em produção ou em estoque como produto acabado.

## 5.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laticínio da Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga, em duplicata, durante os meses de janeiro a maio e, agosto a dezembro de 2008, comparando-se a qualidade microbiológica do ar e de partes componentes de uma câmara fria de área total de 27,6 m<sup>2</sup>, com e sem tratamento com ozônio, utilizada na estocagem de queijo minas frescal.

O equipamento utilizado para aplicação de ozônio no ar ambiente foi um ozonizador de ar da marca Interozone, modelo UEC 125<sup>®</sup>, o qual fornece uma concentração final de ozônio de 0,03 mg.L<sup>-1</sup> de ar.

A qualidade do ar circulante da câmara fria de painel de poliestireno, de medidas de 4,0X3,0X2,3 metros, foi verificada pela determinação dos parâmetros microbiológicos de contagem de aeróbios mesófilos e bolores e leveduras, a partir da exposição de placas de Petri estéreis e descartáveis de 65 cm<sup>2</sup> de área.

Utilizando-se a técnica de *swab*, com hastes flexíveis com pontas de algodão, estéreis e descartáveis, foram realizadas, também, as contagens de aeróbios mesófilos das superfícies da porta, paredes e estante da câmara fria.

Para a contagem de aeróbios mesófilos o meio de cultura utilizado foi o Ágar Plate Count – PCA (DIFCO<sup>®</sup>) enquanto que, para bolores e leveduras, foi utilizado o meio Ágar Batata Acidificado – PDA (DIFCO<sup>®</sup>).

O método de coleta por sedimentação em placas consistiu na exposição a cada dois dias, durante 15 minutos por 60 dias na câmara sem ozônio e, durante 15 minutos por 60 dias com o equipamento de ozônio ligado, perfazendo, deste modo, 120 dias de experimento, de oito placas de Petri,

estrategicamente distribuídas, duas a duas, em quatro pontos da câmara fria, a uma altura de 1,5 m do chão, propiciando um contato direto do ar ambiente com a superfície do agar contido nas placas. Em cada ponto foram colocadas, diariamente, uma placa contendo agar PCA e outra contendo Ágar PDA. Estes pontos de amostragem foram pré-definidos a partir da observação da movimentação dos operadores do estabelecimento no interior da câmara durante suas rotinas de trabalho, que não foram alteradas para a realização do experimento, sendo eles: ao lado da porta de entrada, no fundo, do lado direito e do lado esquerdo da câmara.

Após a coleta por sedimentação, as placas de contagem de aeróbios mesófilos foram incubadas em estufa a 35°C por 48 horas, enquanto que, as com PDA, incubadas em estufa. BOD à temperatura de 25°C por 72 horas. Em seguida, foram realizadas as contagens das colônias, expressas em UFC.cm<sup>2</sup>.dia (APHA, 1992).

Para determinação dos resultados finais foram realizados cálculos, considerando-se a contagem do número de colônias, a área de 65,0 cm<sup>2</sup> das placas de Petri, o total de 1.440 minutos de um dia, e o tempo de 15 minutos de exposição de cada placa.

$$\text{Total de UFC} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ de colônias}/65) \times 1440}{15}$$

15

As amostras de *swab*, realizadas em duplicata, foram colhidas com auxílio de moldes metálicos estéreis determinantes da área de 10 cm<sup>2</sup> de esfregaço, realizados na superfície da face interna da porta, parede da direita, parede da esquerda e fundo da câmara, além de uma prateleira (estante) de polietileno. As coletas foram realizadas a cada 2 dias durante 60 dias com a câmara sem ozônio e a cada 2 dias durante 60 dias com o equipamento gerador de ozônio ligado e proporcionando uma concentração de 0,03 mg.L<sup>-1</sup> de ar e perfazendo 120 dias de experimento. A determinação da contagem de aeróbios mesofilos foi expressa em UFC.10 cm<sup>-2</sup>.

Após a coleta dos *swabs* os mesmos foram colocados em tubos de ensaio contendo 9 ml de solução tampão e agitados vigorosamente a fim de remover totalmente os resíduos aderidos durante a coleta para dar sequência às análises microbiológicas (APHA, 1992) em triplicata.

Não foram alteradas nenhuma das condições do protocolo de limpeza da câmara frigorífica, evitando dessa forma o favorecimento da nova condição de ar ambiente

### 5.2.1 Análise Estatística

Foi realizado para o experimento de exposição de placas de petri um delineamento experimental casualizado com dois tratamentos (com a aplicação de ozônio e sem a aplicação de ozônio), onde 3 placas de Petri foram expostas por 15 min em 4 pontos de avaliação (prateleiras direita e esquerda, fundo e entrada) na câmara fria durante o período de 1 a 60 dias.

Os resultados foram analisados através do procedimento MIXED e medidas repetidas no tempo do programa SAS (SAS, 2004). Para análise do efeito de tratamento utilizou-se o Teste F e para análise de efeito de tempo foi realizada estudo dos dias através de regressão pelo comando CONTRAST, ao nível de significância de 5%.

**Tabela 5.1** – Análise de variância para exposição das placas de desenvolvimento de microrganismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras.

Causa de variação	Grau de liberdade
Ozônio	1
Pontos de avaliação	3
ozônio*pontos de avaliação	3
resíduo A	16
Sub-total	23
Tempo	59
tempo*ozônio	59
tempo*pontos de avaliação	177
tempo*ozônio*pontos de avaliação	177
resíduo B	944
Total	1439

Para os swabs de superfície de paredes e estantes da câmara foi realizado um delineamento experimental casualizado com dois tratamentos (antes da aplicação de ozônio e depois), onde realizados 2 swabs em 5 pontos de avaliação (direita, esquerda, estante, fundo e porta) na câmara fria durante o período de 1 a 30 (60 dias, colhendo as análises a cada 2 dias).

Os resultados foram analisados através do procedimento MIXED e medidas repetidas no tempo do programa SAS (SAS, 2004). Para análise do efeito de tratamento utilizou-se o Teste F e para análise de efeito local de realização do swab foram realizados testes de comparação de médias, através do comando LSMEANS, utilizando-se o teste de Tukey – Kramer, ao nível de significância de 5%.

**Tabela 5.2** – Análise de variância para swabs das paredes e estante da câmara frigorífica.

Causa de variação	Grau de liberdade
Ozônio	1
Pontos de avaliação	4
ozônio*pontos de avaliação	4
resíduo A	10
Sub-total	19
Tempo	29
tempo*ozônio	29
tempo*pontos de avaliação	116
tempo*ozônio*pontos de avaliação	116
resíduo B	309
Total	599

Modelo matemático para os resultados obtidos nas placas e nos swabs:

$$y_{ijk_r} = \mu + T_i + P_j + (TP)_{ij} + \gamma_{ij} + \beta_k + (T\beta)_{ik} + (P\beta)_{jk} + (TP\beta)_{ijk} + \varepsilon_{ijk_r}$$

onde

$y_{ijk_r}$ : é o r-ésimo valor observado para a variável resposta no k-ésimo tempo para o i-ésimo tratamento no j-ésimo ponto;

$\mu$  : constante comum a todas as observações,

$T_i$  : efeito do i-ésimo tratamento,

$P_j$  : efeito do j-ésimo ponto de avaliação,

$(TP)_{ij}$  : efeito da interação do i-ésimo tratamento e o j-ésimo ponto de avaliação

$\gamma_{ij}$  : erro associado às parcelas ,

$\beta_k$  : efeito do k-ésimo tempo,

$(T\beta)_{ik}$  : efeito da interação do i-ésimo tratamento e k-ésimo tempo,

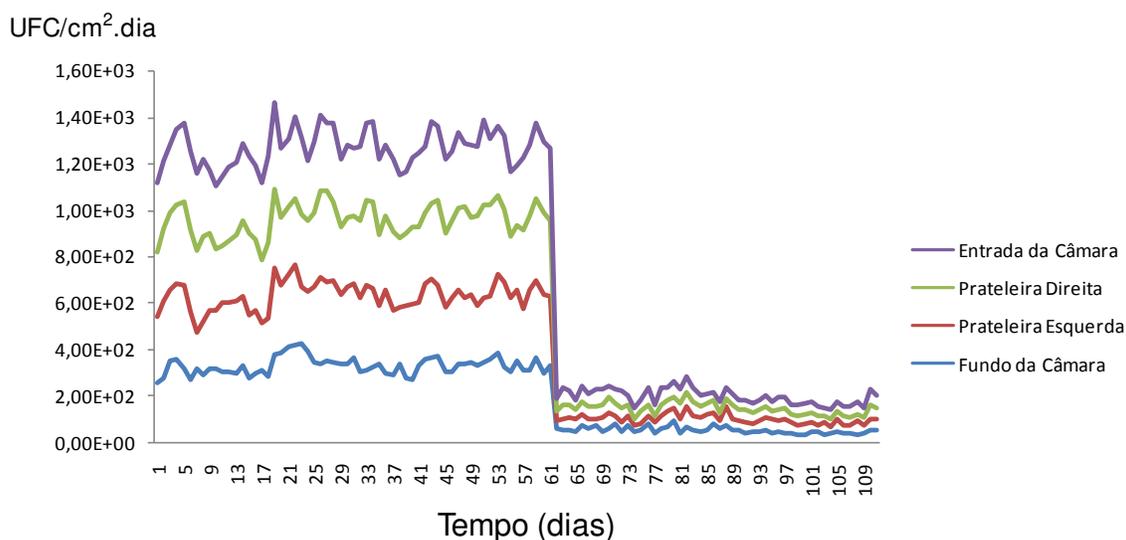
$(P\beta)_{jk}$ : efeito da interação do j-ésimo ponto de avaliação e k-ésimo tempo,

$(TP\beta)_{ijk}$ : efeito da interação do i-ésimo tratamento, j-ésimo ponto de avaliação e k-ésimo tempo,

$\varepsilon_{ijkkr}$  : erro associado à observação  $y_{ijkkr}$ .

### 5.3 Resultados e Discussão

Os resultados para as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos em todos os pontos de amostragem antes e após a utilização do gás ozônio na concentração de  $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ , esta demonstrado na figura 5.1 e as médias do logaritmo (Log UFC/mL) das contagens do microrganismo demonstrado na tabela 5.2.



**Figura 5.1** – Representação gráfica das populações de microrganismos aeróbios mesófilos com e sem aplicação do gás ozônio em câmara fria.

A contagem inicial (tempo de microrganismos aeróbios mesófilos na entrada da câmara, prateleira esquerda, prateleira direita e fundo da câmara foi de  $3,29 \times 10^2$ ;  $5,02 \times 10^2$ ;  $3,24 \times 10^2$  e  $3,15 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>/dia, respectivamente, o que gerou uma população média para todos os pontos de  $3,19 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>/dia. A contagem após a aplicação do gás ozônio para o mesmo microrganismo e os mesmos pontos foi de  $5,12 \times 10^1$ ;  $5,01 \times 10^1$ ;  $4,95 \times 10^1$  e  $4,87 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup>/dia, respectivamente, conforme pode ser verificado na figura 5.1, o que representa uma média para todos os pontos amostrados, durante os 60 dias de experimento de  $4,97 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup>/dia.

A utilização de ozônio na câmara fria, a partir do dia 60, proporcionou uma diminuição estatisticamente significativa pelo Teste F ( $P < 0,05$ ) no logaritmo da contagem de UFC de mesófilos (figura 5.1). A redução para os microrganismos aeróbios mesófilos, considerando os valores médios para todos os pontos e dias amostrados, foi de 0,81 ciclos logaritmos (Tabela 5.3).

**Tabela 5.3** – Médias (Log UFC/mL) e respectivos desvios padrão das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos presentes na câmara frigorífica de queijo minas frescal com e sem a utilização de ozônio na concentração de 0,03 mg.L<sup>-1</sup>.

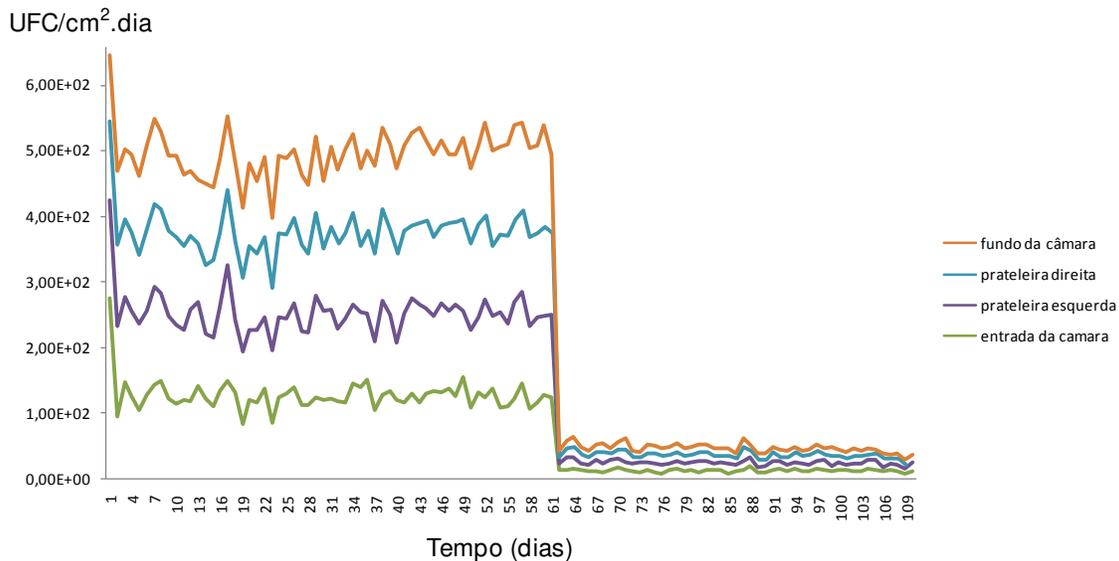
tratamento	Log (contagem UFC+1)		desvio padrão
com ozônio	1,67 <sup>b</sup>	±	0,166
sem ozônio	2,70 <sup>a</sup>	±	5,397

Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si pelo Teste F (P <0,05).

Ao se comparar os resultados aqui encontrados observamos semelhanças com outros trabalhos que avaliaram a eficiência do ozônio em diferentes alimentos. Chiattonne (2006) avaliou a ação do gás ozônio de 0,5 e 1,0 ppm na sanificação de carne bovina maturada e observou a redução de bactérias aeróbias mesófilas em 0,81 e 0,95 ciclos logarítmicos, respectivamente. Entretanto o autor relata que o tratamento tornou-se mais eficaz em combinação com o ácido ascórbico (0,2 e 0,5%), chegando a uma redução de 1,34 log UFC/g (1,0 ppm e 0,5% ácido ascórbico)

Não houve efeito para dia de avaliação, ponto de exposição das placas e nem para as interações tratamento-ponto de exposição, tratamento-dia de avaliação, ponto de exposição-dia de avaliação e tratamento-ponto de exposição-dia de avaliação (P>0,05) no logaritmo da contagem de aeróbios mesófilos. Ou seja, não foram verificadas diferenças significativas ao se considerar os pontos amostrados e o decorrer dos dias para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos antes e após a aplicação do sanitizante.

A figura 5.2 demonstra, graficamente, o comportamento das populações de bolores e leveduras, nos diversos pontos amostrados, durante o período de 60 dias com a câmara sem o tratamento e dos próximos 60 dias com o equipamento de ozônio em funcionamento emitindo, diariamente, a concentração de 0,003 mg.L<sup>-1</sup> do gás, enquanto a tabela 5.3 apresenta os resultados da média do logaritmo das contagens de bolores e leveduras em câmara frigorífica de estocagem de queijo minas frescal.



**Figura 5.2** – Representação gráfica das populações de bolores e leveduras com e sem aplicação do gás ozônio em câmara fria.

Os bolores e leveduras na entrada da câmara, prateleira esquerda, prateleira direita e fundo da câmara apresentaram médias de contagens, após a utilização de ozônio na concentração de  $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ , durante os 60 dias de amostragens de  $1,18 \times 10^2$ ;  $1,23 \times 10^2$ ;  $1,22 \times 10^2$  e  $1,17 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>/dia, respectivamente, estes resultados não foram estatisticamente diferentes para  $P < 0,05$ .

Observa-se que houve uma diminuição média de todos os pontos amostrados e durante os 60 dias de experimento de  $1,24 \times 10^2$  para  $1,20 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>/dia, apresentando uma redução estatisticamente significativa pelo Teste F ( $P < 0,05$ ). Assim, o sanitizante empregado proporcionou uma redução média de 1,01 ciclos logarítmicos.

**Tabela 5.4** – Médias (Log UFC/mL) e respectivos desvios padrão das contagens de bolores e leveduras presentes na câmara frigorífica de queijo minas frescal com e sem a utilização de ozônio na concentração de 0,03 mg.L<sup>-1</sup>.

Tratamento	contagem UFC		desvio padrão
com ozônio	1,09 <sup>a</sup>	±	0,163
sem ozônio	2,09 <sup>b</sup>	±	0,090

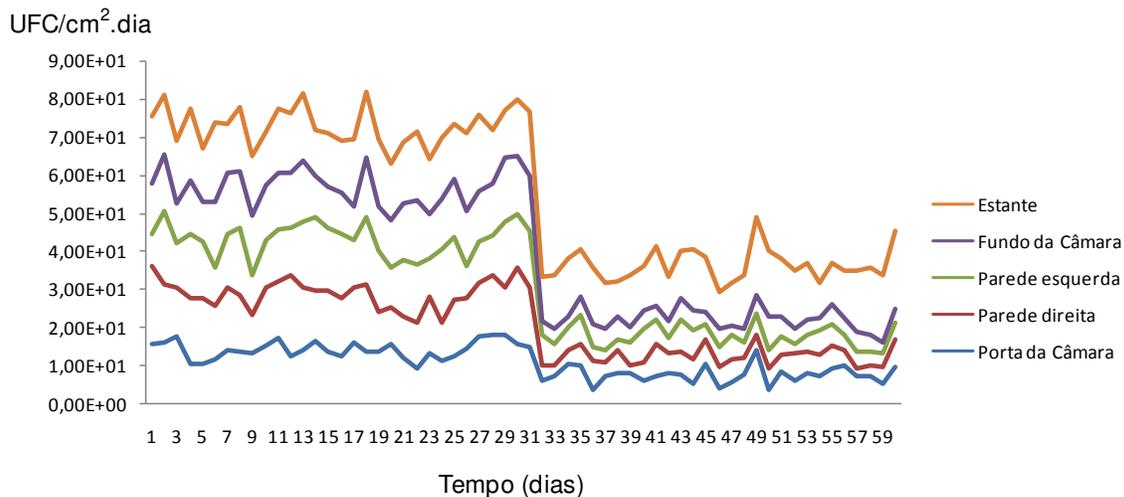
Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si pelo Teste F (P <0,05).

Barth *et al.* (1995) verificaram o efeito da estocagem de amoras sob ozônio em relação ao conteúdo de antocianinas e crescimento de bolores e leveduras. As amoras foram colhidas e estocadas por 12 dias, a 2°C, nas concentrações 0,0; 0,1 e 0,3mgL<sup>-1</sup> de ozônio. A estocagem em câmara com ozônio suprimiu o crescimento fúngico durante os 12 dias, enquanto na estocagem sem o gás apenas 20% das frutas apresentaram decaimento.

Não houve efeito para dia de avaliação, ponto de exposição das placas e nem para as interações tratamento-ponto de exposição, tratamento-dia de avaliação, ponto de exposição-dia de avaliação e tratamento-ponto de exposição-dia de avaliação (P>0,05) para o logaritmo da contagem de unidades formadoras de colônias de bolores e leveduras.

Porém, houve efeito da interação tratamento-dia de avaliação (P<0,05), conforme apresentado na figura 5.2. O estudo do dia de avaliação foi realizado em cada tratamento. Os dois tratamentos seguiram equações lineares significativas (P<0,05), a média do logaritmo da contagem de UFC de bolores e leveduras foi menor (P<0,05) do que quando a câmara não foi tratada, além disso, o tratamento com ozônio provocou uma diminuição linear do logaritmo da contagem de UFC de bolores e leveduras com o decorrer do tempo, diferentemente do que ocorreu quando a câmara não foi tratada.

A figura 5.3 e a tabela 5.5 apresentam as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos antes e após a aplicação do sanitizante e os logarítmicos médios de *swab* em cada um dos pontos amostrados, respectivamente.



**Figura 5.3** – Representação gráfica das populações de microrganismos aeróbios mesófilos com e sem aplicação do gás ozônio em superfícies de câmara fria.

**Tabela 5.5** – Médias (Log UFC/mL) e respectivos desvios padrão das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos presentes nas superfícies e estante da câmara frigorífica de queijo minas frescal com e sem a utilização de ozônio na concentração de 0,03 mg.L<sup>-1</sup>.

	Local					erro padrão
	direita	esquerda	estante	fundo	porta	
Antes	1,18 <sup>aA</sup>	1,17 <sup>aA</sup>	1,22 <sup>aA</sup>	1,17 <sup>aA</sup>	1,17 <sup>aA</sup>	0,006
Depois	0,75 <sup>cB</sup>	0,77 <sup>bcB</sup>	1,14 <sup>aA</sup>	0,73 <sup>cB</sup>	0,90 <sup>bB</sup>	0,013
erro padrão	0,024	0,023	0,010	0,023	0,018A	

Letras minúsculas iguais na mesma linha são estatisticamente iguais pelo Tukey – Kramer (P>0,05)

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna são estatisticamente iguais pelo Teste F (P>0,05)

Observou-se que os pontos de amostragem antes do tratamento apresentaram contagens de 1,51x10; 1,48x10; 1,66x10, 1,48x10 e 1,48x10 UFC.cm<sup>-2</sup>, respectivamente para a parede direita, parede esquerda, estante, parede do fundo e porta. Estas contagens não apresentam diferenças estatisticamente significativas pelo Tukey – Kramer (P<0,05).

Endres *et al.* (2010) verificaram resultados semelhantes aos deste estudo ao estudarem o ar ambiente de câmaras frias de maturação de queijo

ralado e observarem contagens de bolores e leveduras de  $4,3 \times 10^0$  UFC.placa<sup>-1</sup>, quando da realização de swabs e  $9,1 \times 10^0$  UFC/100L ar, quando utilizaram um coletor de ar para enumerar populações de bolores e leveduras.

Após a aplicação do ozônio na concentração de  $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ , as contagens de aeróbios mesófilos reduziram para  $5,62 \times 10^0$ ;  $5,88 \times 10^0$ ;  $1,38 \times 10^1$ ;  $5,37 \times 10^0$  e  $7,94 \times 10^0$  UFC.cm<sup>-2</sup>, respectivamente para os pontos amostrados. A aplicação do sanitizante proporcionou reduções estatisticamente significativas ao teste de Tukey – Kramer ( $P < 0,05$ ), para as paredes da direita, esquerda, fundo e porta de 0,43; 0,40; 0,44 e 0,27 ciclos logaritmos, respectivamente. Porém, a estante apresentou uma redução de 0,08 ciclos logaritmos, não sendo, desta forma, considerada uma diferença significativa pelo Tukey – Kramer ( $P < 0,05$ ).

Houve, ainda, efeito de interação entre o tratamento X ponto de avaliação ( $P < 0,05$ ), o estudo do efeito da aplicação do ozônio foi realizado em cada ponto de avaliação e o efeito dos pontos de avaliação foi realizado antes e depois da aplicação de ozônio.

Após o tratamento com ozônio a contagem de aeróbios mesófilos na estante foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) dos que os outros pontos de avaliação, a contagem na porta foi semelhante na da prateleira esquerda ( $P > 0,05$ ) e diferiu da prateleira direita e do fundo ( $P < 0,05$ ) enquanto que as contagens no fundo e prateleiras direita e esquerda não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ).

#### **5.4 Conclusões**

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que a utilização do gás ozônio na concentração de  $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$  em câmaras frias de produção e armazenamento de queijo minas frescal possibilita uma melhor qualidade do ar de circulação e das superfícies de equipamentos e instalações, em virtude de uma redução média e constante de, respectivamente 0,81 e 1,01 ciclos logarítmicos na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras.

## 5.5 Agradecimentos

Agradeço à Fazenda da Aeronáutica pela possibilidade de utilização das instalações do laticínio e pelo apoio com Mão de obra qualificada para a realização desta pesquisa.

## 5.6 Referências Bibliográficas

APHA, **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 18 ed. *American Public Health Association, Washington, DC*, 1992.

BARTH, M.M.; ZHOU, C.; MERCIER, J.; PAYNE, F.A. Ozone Storage Effects on Anthocyanin Content and Fungal Growth in Blackberries. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1286-1288, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. **Resolução RDC nº 145 de 13 dez de 1996**. Regulamento técnico MERCOSUL de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal, 1996.

CHIATTONE, P. **Ozônio e ácido ascórbico na coloração e microbiota da carne bovina maturada**. 2006. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

ENDRES, J.C.T.; POMPERMAYER, D.M.C.; SILVA, J.H. **Avaliação da contaminação em indústria processadora de queijo ralado: estudo de caso**. 3ºSIMPOSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 2010

FRAZIER, W.C; WESTHOFF, D.C. **Microbiologia de los alimentos**. 4.ed. Acribia: Zaragoza, 1993. 681p.

KHADRE, M.A., YOUSEF, A.E. Decontamination of a multilaminated aseptic food packaging material and stainless steel by ozone. **Journal of Food Safety**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2001.

KHADRE, M.A., YOUSEF, A.E., KIM, J.G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**.Chicago, v.66, n.9, p.1242-1252, 2001B.

KIM, J.G., YOUSEF, A.E., CHISM. G.W. Use of ozone to inactivate microorganisms on Lettuce.**Journal of Food Safety**, v.19, p.17-37, 1999A.

OTHMANE, M.B.; HAVET, M.; GEHIN, E.; SOLLIEC, C.; ARROYO, G. Predicting cleaning time of ventilation duct systems in the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 105, p. 400-407, 2011.

SALVADOR, A; ABAD, I; ARNAL, L.; MARTINEZ-JÁVEGA, J.M. Effect of ozone on postharvest quality of persimmon. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 6, p. 443 – 446, 2006.

SAS INSTITUTE 9.1 User's guide. Cary: SAS Institute Inc., 2004. 1040p.

VEIGA, S. M. O. M. Utilização de água potável, hiperclorada e ozonizada e do ultra-som, combinados ou não, em um protótipo de chiller, para a sanificação de carcaças de frango. In: \_\_\_\_\_. **Sanificação de carcaças de frango: processos alternativos**. 2003. cap. 3, p.99-166, p.291. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.